

**Univerzita Karlova v Praze**  
**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



**MUDr. Milan Chovanec**

Plicní hypertenze

Pulmonary hypertension

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Jan Herget DrSc.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15.04.2013

Milan Chovanec

**Identifikační záznam:**

CHOVANEC, Milan. *Plicní hypertenze [Pulmonary hypertension]*. Praha, 2013. 28s., 4 přílohy. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav fyziologie. Vedoucí práce Herget, Jan.

**Poděkování:**

Prof. MUDr. Janu Hergetovi DrSc. za podporu a moje vedení po celou dobu postgraduálního studia, zároveň za podporu při sestavování této práce a kritickou diskusi jejího obsahu.

Děkuji laborantkám ústavu fyziologie 2.LFUK paní Olze Hniličkové a slečně Pavlíně Smolkové za pomoc a spolupráci při všech prezentovaných pokusech.



# Obsah

Seznam použitých zkratk	1
Seznam obrázků	2
Abstrakt	3
Abstract	4
1. Úvod	5
1.1 Rozdíly mezi plicní a systémovou cirkulací	5
1.2 Plicní hypertenze a chronická hypoxie	6
1.3 Oxid dusnatý	10
1.4 Volné kyslíkové radikály	11
1.5 Interakce ROS a NO při rozvoji HPH	12
2. Cíle práce	15
2.1 Pokus č. 1	15
2.1.1 Úvod a hypotéza	15
2.1.2 Použitá metodika	15
2.1.3 Výsledky	16
2.1.4 Diskuse k publikaci	17
2.2 Pokus č.2	18
2.2.1 Úvod a hypotéza	18
2.2.2 Použitá metodika	18
2.2.3 Výsledky	19
2.2.4 Diskuse k publikaci	20
3. Závěr	21
4. Souhrn	22
5. Summary	23
6. Vlastní publikace k tématu	24
7. Seznam literatury	25
8. Publikace č. 1	30
9. Rukopis publikace č. 2	38
10. Publikace č. 3	53
11. Rukopis publikace č. 4	59

## Seznam použitých zkratek

**BH4/BH2** – tetra/dihydropterin

**cGMP** - cyklický guanosin monofosfát

**NO** – oxid dusnatý

**NOS** – syntáza oxidu dusnatého

**HPH** – hypoxická plicní hypertenze

**HPV** – hypoxická plicní vazokonstrikce

**PAP** – střední krevní tlak v plicnici

**PDE** – fosfodiesteráza

**ROS** – volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)

**SOD** – superoxid dismutáza

## Seznam obrázků

**Obrázek č. 1:** Schéma rozvoje hypoxické plicní hypertenze.

**Obrázek č. 2:** Původní představa vztahu mezi vazokonstrikcí a remodelací periferních plicních arteriol.

**Obrázek č. 3:** Histologické zobrazení remodelovaných periferních plicních arteriol („double laminated vessels“).

**Obrázek č. 4:** Kontrakce hladké svaloviny aktivovaná G-proteiny.

**Obrázek č. 5:** PAP u zvířat vystavených chronické hypoxii ev. chronické hypoxii s hyperkapnií po dobu 3 týdnů.

**Obrázek č. 6:** Plazmatická koncentrace nitrotyrozinu u zvířat vystavených chronické hypoxii ev. chronické hypoxii s hyperkapnií po dobu 4 dnů.

**Obrázek č. 7:** PAP u zvířat vystavených působení chronické hypoxii.

**Obrázek č. 8:** Procento remodelovaných preriferních plicních arteriol („double laminated“ vessels) u zvířat vystaveny působení chronické hypoxii.

## Abstrakt

Hyperkapnii je možné terapeuticky využít v léčbě kriticky nemocných se sklonem k hypoxii (kardio – pulmonální selhání), jako prevenci rozvoje plicní hypertenze. Tato práce vysvětluje klinické pozorování kdy pacienti s chronickou obstrukční plicní nemocí s významnou obstrukcí dýchacích cest, kteří jsou vystaveni účinku hypoxie a zároveň účinku hyperkapnie, mají méně rozvinutou plicní hypertenzi oproti zdravým lidem žijícím ve vysoké nadmořské výšce vystavených porovnatelné hypoxii bez hyperkapnie.

Mortalita pacientů s plicní hypertenzí úzce souvisí s pravostrannými srdečními hemodynamickými parametry (střední tlak v plicnici, krevní tlak v pravé srdeční komoře, srdeční index). Současná doporučená léčba plicní hypertenze (inhibitory endotelinových receptorů, agonisty prostacyklinových receptorů, inhibitory fostodiesteráty) je extrémně drahá, ale málo účinná (první dva přístupy). Terapie prezentována v naší práci je v porovnání se současnou léčbou plicní hypertenze levná a hemodynamicky účinná. V budoucnosti by mohla představovat účinnou alternativu k současnému přístupu.

**Klíčová slova:** plicní hypertenze, chronická hypoxia, hyperkapnia, L-arginine, sildenafil.

## **Abstract**

Hypercapnia could be used in the treatment of critically ill patients with chronic hypoxia (cardio – pulmonary failure) as a prevention against the development of hypoxic pulmonary hypertension. This work showed the reason based on the observed difference between patients with chronic obstructive pulmonary disease and high altitude dwellers. Both groups have similar levels of oxygen saturation of haemoglobin, high altitude residents have no hypercapnia compared to patients with chronic obstructive pulmonary disease but hypercapnic sea level patients have less severe lung hypertension than mountain residents.

Mortality of people with diagnosed pulmonary arterial hypertension is closely associated with right ventricle hemodynamic function (pulmonary arterial pressure, right atrial pressure and cardiac index). Recently, the therapy that has been used for pulmonary arterial hypertension has consisted of three main targets; firstly: endothelin receptor blockers, secondly: prostacycline and its analogues, thirdly: PDE-5 inhibitors in order to increase the concentration of endogenous NO and its mutual combination. Unfortunately, it is clear that the recent clinical therapy of pulmonary arterial hypertension is extremely expensive, with minimal or no effect on right ventricle hemodynamic function. In fact, the significance of the increase of prostacycline and endothelin throughout the duration of pulmonary arterial hypertension is a consequence rather than a cause of pulmonary arterial hypertension. The treatment presented in the recent work could play an important role in the treatment of pulmonary arterial hypertension in the future.

**Key words:** pulmonary hypertension, chronic hypoxia, hypercapnia, L-arginine, sildenafil.

# 1. ÚVOD

## *1.1 Rozdíly mezi plicní a systémovou cirkulací*

Systémová plicní cirkulace jsou jak morfologicky tak i funkčně odlišné. V systémové cirkulaci přestupuje kyslík z krve do okolních tkání, zatímco v plicích probíhá proces opačný. V plicní cirkulaci je oproti systémové cirkulaci několikanásobně nižší krevní tlak, což je výhodné vzhledem k tenké a „křehké“ alveolo-kapilární membráně.

Příčinou rozdílného krevního tlaku je odlišný bazální cévní tonus, který je v plicní cirkulaci nízký. Nízký cévní tonus souvisí s množstvím a aktivitou hladké svaloviny v stěně cév. V plicní cirkulaci je množství hladkého svalu v porovnání se systémovými cévami stejného kalibru menší. Svalovina v periferních prealveolárních cévách se nenachází po celém obvodu (Hislop and Reid 1978).

Další odlišností obou cirkulací je rozdílná závislost průtoku na zvyšujícím se perfuzním tlaku. Průměr cévy závisí na transmurálním tlaku v cévě. V plicní cirkulaci průměr cévy závisí proto i na intravaskulárním a extravaskulárním (alveolárním) tlaku, povrchovém napětí v alveolech, na vlastnostech plicního parenchymu a také na objemu plic (Dawson et al. 1988; Hampl and Herget 1995).

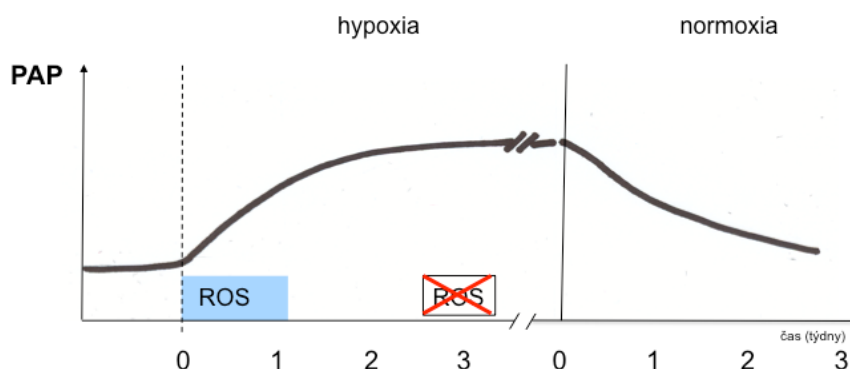
Plícemi protéká celý minutový srdeční výdej, zatímco v systémovém krevním oběhu je distribuován do jednotlivých orgánů jenom jeho větší nebo menší část. Rychlost průtoku krve plicním cévním řečištěm je vyšší než v systémovém řečišti. S rychlostí průtoku souvisí hodnota střížného napětí (shear stress), která je v plicních cévách větší.

Důležitým funkčním rozdílem plicní a systémové cirkulace je reakce na akutní hypoxii. V systémových cévách při hypoxii dochází obvykle k různě velké vazodilataci. Důsledkem je pak zvýšená perfúze příslušné cévní oblasti, což zajistí přiměřený přísun kyslíku a živin k buňkám. V plicních cévách by tento mechanismus nebyl výhodný, protože vazodilatací by se v nedostatečně ventilovaných plicních segmentech zvyšovala žilní příměs a tím by se zhoršovala transportní schopnost plic pro kyslík. Působením akutní hypoxie (řádově minuty), způsobenou nedostatečnou ventilací plicních segmentů, dochází v plicní cirkulaci, na rozdíl od systémové cirkulace, k vazokonstrikci arteriol a tím k omezení žilní příměsi. Za tento

mechanismus, vyvolaný působením akutní hypoxie, je odpovědná depolarizace buněk hladké plicní cévní svaloviny, vyvolaná hypoxickou inhibicí napěťově řízených draslíkových kanálů a zvýšenou intracelulární koncentrací vápníku (Archer et al. 1994; Hampl et al. 1995).

## 1.2 Plicní hypertenze a chronická hypoxie

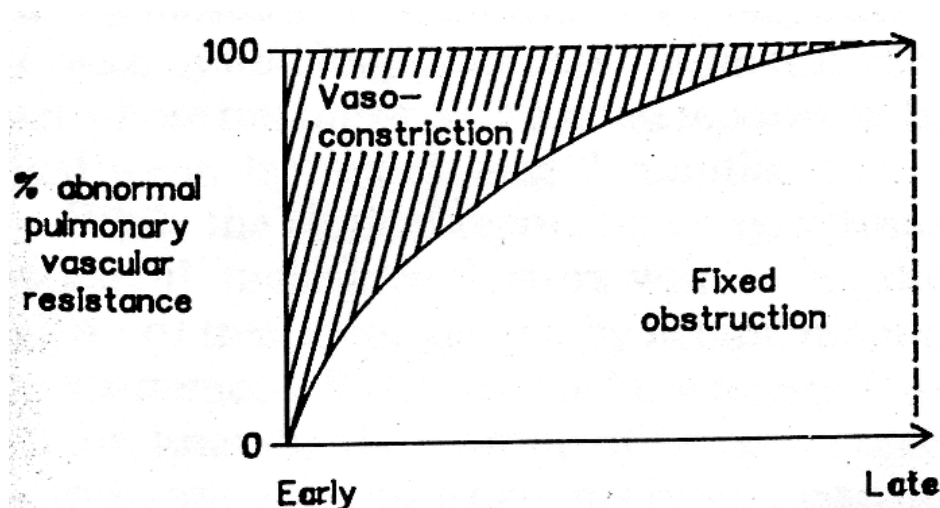
Reakcí plicní cirkulace na poškození je zvýšení odporu proudění krve a následný vznik plicní hypertenze. Plicní hypertenze je chronicky zvýšený krevní tlak v arteria pulmonalis (PAP) nad hodnotu 25 mmHg. Jednoduchým, levným a dobře reprodukovatelným způsobem, jak můžeme plicní hypertenzi vyvolat, je působení chronické hypoxie (dny až týdny). Chronickou hypoxii můžeme vyvolat snížením barometrického tlaku (hypobarická hypoxie) nebo snížením koncentrace kyslíku ve vdechované směsi plynů při normálním barometrickém tlaku (normobarická hypoxie). První způsob vyvolání plicní hypertenze je typický při pobytu ve vysokých nadmořských výškách, druhý při poruchách plicní ventilace. Působením chronické hypoxie se zvyšuje periferní plicní cévní odpor a vzniká chronická hypoxická plicní hypertenze (HPH). Po dosažení určité hodnoty plicního cévního odporu již k dalšímu zvyšování odporu v plicní cirkulaci nedochází i když působení chronické hypoxie přetrvává, tzn. že HPH není progresivní. Po přerušení expozice hypoxii dochází v průběhu týdnů a měsíců k návratu k původním hodnotám plicního cévního odporu (Herget et al. 1978; Sebkhi et al. 2003), tzn. že HPH je reverzibilní (obrázek č. 1). Na základě těchto vlastností je vhodné na HPH nahlížet ne jako na nemoc, ale spíše jako na adaptační mechanismus plicního cévního řečiště na chronický nedostatek kyslíku.



Obrázek č.1: Schéma rozvoje hypoxické plicní hypertenze.

PAP – střední krevní tlak v plicnici, ROS – volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)

Na rozvoji HPH se podílejí dva hlavní mechanismy odpovědné za zvýšení cévního plicního periferního odporu: 1) vazokonstrikce prealveolárních plicních cév a 2) jejich morfologická přestavba – strukturální remodelace. Na začátku rozvoje HPH snad převládá vazokonstrikce, s pokračující chronickou hypoxií postupně převládá efekt strukturální remodelace plicních arteriol (Reeves et al. 1986, obrázek č. 2). Mechanismus vazokonstrikce, způsobené chronickou hypoxií se liší od vazokonstrikce, vyvolané působením akutní hypoxie (HPV). Při chronické hypoxii je reakce na akutní hypoxii sice oslabená, ale stále přítomná. Vazokonstrikce při HPH je přítomna při plicním zánětu, plicním edému i v jiných situacích kdy, HPV zcela chybí.



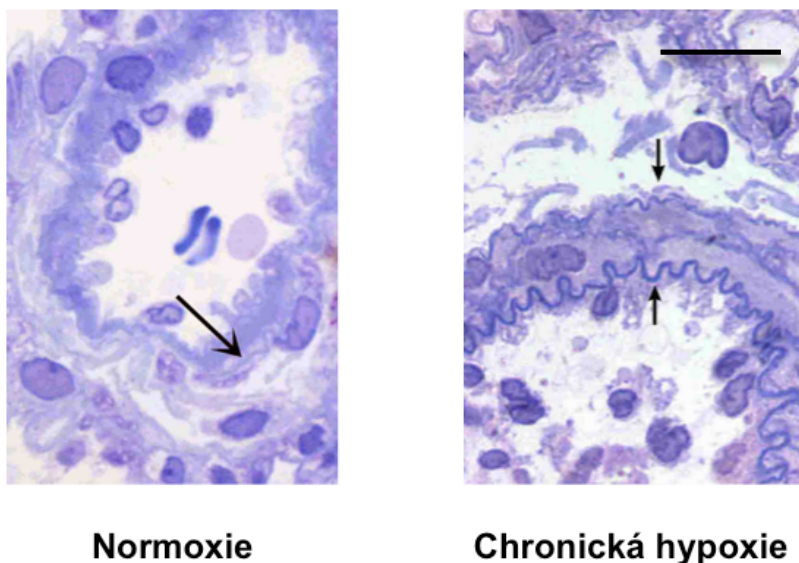
Obrázek č. 2: Původní představa vztahu mezi vazokonstrikcí a remodelací periferních plicních arteriol.

REEVES JT, GROVES BM, TURKEVICH D: The case for treatment of selected patients with primary pulmonary hypertension. Am Rev Respir Dis 134:1986 342-346.

Morfologické změny souvisejí s produkcí hladké svaloviny v oblasti tunica media v stěně prealveolárních arteriol. Zbytněním tunica media, kde původně svalovina není nebo tvoří jen nesouvislou vrstvu, vzniká v periferních plicních arteriolách tvorbou svaloviny histologický obraz „dvojitě laminovaných cév“. Vrstva hladkého svalu je ohraničena vnitřní a zevní elastickou vrstvou (obrázek č. 3). Existuje starší představa, že tvorba svaloviny v místech, kde původně nebyla (nebo byla v omezené míře), způsobí zmenšení průměru periferních plicních arteriol (roste „dovnitř“ lumen cévy, encroaching inward) a tím zvýší periferní plicní cévní odpor



(Barer 1979). Zvýšením periferního plicního odporu se klinicky projeví i mimo plíce rozvojem hypertrofie pravé srdeční komory a vznikem cor pulmonale.

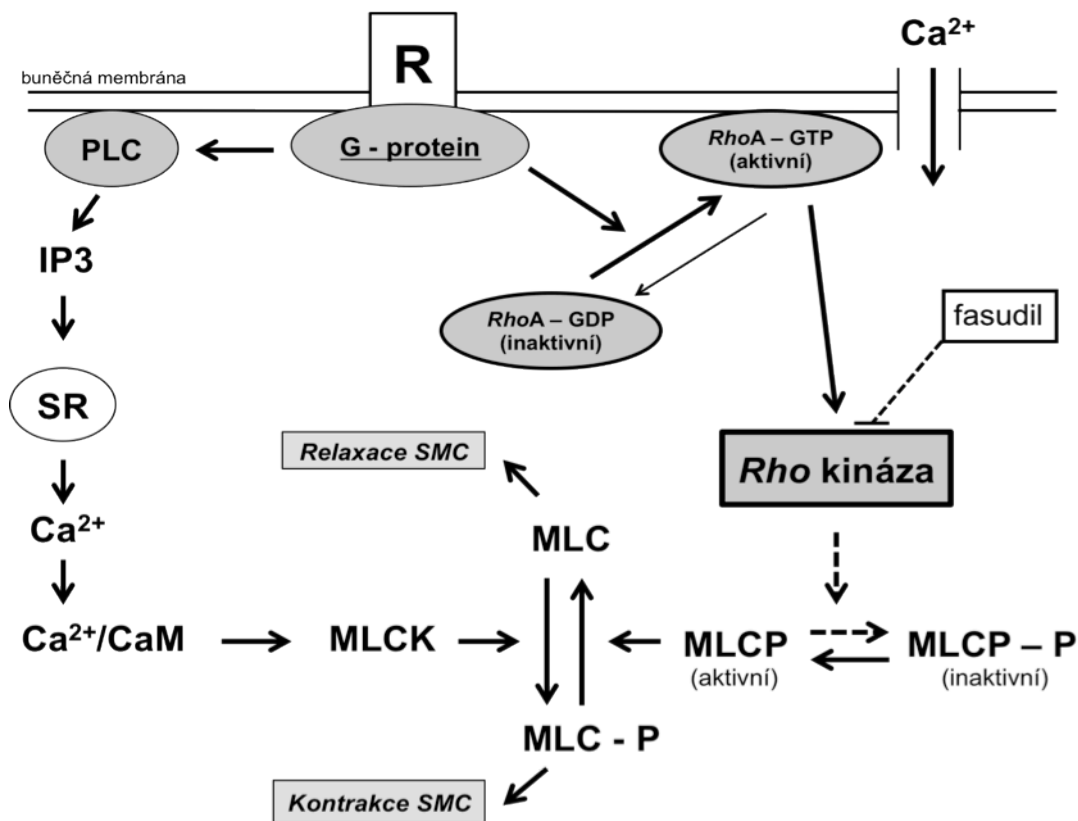


Obrázek č. 3: **Histologické zobrazení remodelovaných periferních plicních arteriol („double laminated vessels“).**

Vlevo: neremodelovaná periferní plicní arteriola s nerozšířenou tunica media (dlouhá šipka).  
 Vpravo: remodelovaná periferní plicní arteriola působením chronické hypoxie se zbytnělou tunica media a viditelnou lamina elastica externa a interna (malé šipky).  
 Barvení Toluidinová modř. Značka = 20  $\mu$ m

Podíl remodelace plicních periferních arteriol a její vztah k vápníkové sensitizaci zatím není uspokojivě vyřešen. V poslední době se objevují názory svědčící proti tomu, že remodelace plicního cévního řečiště působením chronické hypoxie vede ke zvýšení plicní cévní rezistence (Fagan et al. 2004; Howell et al. 2004). Podle těchto názorů hraje působení chronické hypoxie snad důležitější roli na změnu citlivosti plicních hladkých svalových buněk k vápníku – vápníková sensitizace (Somlyo and Somlyo 2003). Tyto výsledky byly zatím získány pouze nepřímou farmakologickou inhibicí *Rho* kinázového systému (fasudil), není proto možné vyloučit i jiný možný mechanismus účinku uvedeného léku (obrázek č. 4). Citlivost k vápníku a vazokonstrikce, způsobená systémem *Rho* kináz, může hrát roli v rozdílech vazokonstrikce indukované působením akutní a chronické hypoxie.

Při působení chronické hypoxie a při rozvoji HPH hrají významnou roli oxid dusnatý a volné kyslíkové radikály, které ovlivňují jak cévní tonus, tak remodelaci plicních periferních cév.



Obrázek č. 4: **Kontrakce hladké svaloviny aktivovaná G-proteiny.**

MLC: lehké řetězce myozinu (myosin light chain), MLCK: kináza lehkých řetězců myozinu, MLCP: fosfatáza lehkých řetězců myozinu, R: membránový receptor spážený s G-proteinem, PLC: fosfolipáza C, IP3: inozitol-1-3-5-trisfosfát, SR: sarkoplazmatické retikulum, CaM: kalmodulin, -P: fosforylace  
Převzato a modifikováno z: Nagaoka T, et al., Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171, 494-499

### 1.3 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je radikál vyskytující se hlavně v plynné formě. NO je produkován téměř všemi tkáněmi savců a hraje důležitou roli v řadě biologických pochodů, hlavně v regulaci hemodynamiky, neurotransmisí a zánětu (Ignarro 2000). V plicích vzniká v endotelových buňkách, reakcí semi-esenciální aminokyseliny (v dětství esenciální, v dospělosti nikoli) L-arginin (Palmer et al. 1988) s atomem kyslíku, který pochází z molekuly kyslíku (Moncada et al. 1989). Jako produkt této reakce vzniká aminokyselina L-citrulin (Palmer and Moncada 1989). Celá reakce probíhá v několika krocích pomocí komplexního enzymu NO syntázy (NOS). Tento enzym se v živých organismech nachází ve třech izoformách (Knowles and Moncada 1994): neuronální NOS (nNOS), konstitučně exprimovaná v mozku, dále endoteliální NOS (eNOS), konstitučně exprimovaná endotelem, a konečně inducibilní NOS (iNOS), exprimována dle potřeby v různých buňkách (makrofágy, neutrofilní granulocyty, endotelové buňky atd.). V plicní cirkulaci v časných fázích působení chronické hypoxie produkuje iNOS několikanásobně větší množství NO v porovnání s produkcí konstituční eNOS (Hampl et al. 2006). Vytvořený oxid dusnatý difunduje z endotelových buněk do hladkých svalových buněk, kde působí pomocí druhého posla, cyklickým guanosin monofosfátem (cGMP) (Murad 1986); cGMP aktivuje vápníkem řízené draslíkové kanály, způsobuje hyperpolarizaci buněčné membrány hladkých svalových buněk plicních arteriol, což působí snížení intracelulární koncentrace vápníku a tím nakonec vazodilataci. Metabolismus cGMP je v buňce plicního cévního hladkého svalu ovlivněn aktivitou hydrolytického enzymu fosfodiesteráza (PDE). V lidském organismu existuje minimálně 7 izoform tohoto enzymu s různou specifitou k cyklickým nukleotidům. Aktivita PDE5 hraje důležitou roli při ovlivňování tonu cévního hladkého svalu plicních arteriol při stavech, souvisejících se zvýšenou produkcí NO (Braner et al. 1993; Ziegler et al. 1995) i při rozvinuté chronické hypoxické plicní hypertenzi (Cohen et al. 1996). Inhibice PDE je účinná také u pacientů s plicní arteriální hypertenzí (Michelakis et al. 2002) a je doporučována v současné době jako jedna ze tří možností farmakologické léčby plicní arteriální hypertenze u lidí (Galie et al. 2009).

Představa, že nízký cévní plicní tonus je následek zvýšené bazální produkce NO (při plicní hypertenzi by byla pak tato produkce NO snížena), se nepotvrdila (Adnot et al. 1991). Vydechované množství NO i plazmatická koncentrace NO a jeho metabolitů (nitráty, nitrity) v zdravé nepoškozené plicní cirkulaci je prakticky nulová, při chronické hypoxii se tato produkce významně zvýší. Podáním neselektivního blokátoru NOS, L-NAME nedošlo k zvýšení krevního tlaku v plicnici zdravé plicní cirkulace. Na druhou stranu podání L-NAME při rozvinuté HPH už zvýšený PAP ještě více zvýšilo (Hampl et al. 1993; Isaacson et al. 1994). Při chronické hypoxii je také zvýšená produkce NO jak ukazuje nepřímo detekce zvýšené exprese NOS (Xue et al. 1994; Xue and Johns 1996).

#### ***1.4 Volné kyslíkové radikály***

Koncentrace volných kyslíkových radikálů (ROS) se zvyšuje v plicní cirkulaci při působení chronické hypoxie jak in-vivo tak in-vitro (Chang et al. 1989). Působení ROS souvisí s remodelací periferních plicních arteriol. Produkce ROS je v buňce lokalizovaná na několika místech (pro přehled viz Herget et al. 2000): 1) dýchací řetězec mitochondrie – při hypoxii se zvyšuje produkce superoxidu, 2) aerobní enzymy s flavinovými koenzymy při hypoxii produkují zvýšené množství superoxidu. 3) aktivita xantin oxidázy se při hypoxii zvyšuje. 4) NADPH oxidáza fagocytů, hlavně makrofágů, produkuje superoxid a peroxid vodíku. Tato aktivita je zvýšená předchozí hypoxií. Zdrojem ROS je i NOS. Produkce oxidu dusnatého NOS je podmíněná interakcí dvou podjednotek enzymu; tato interakce je umožněna kofaktorem tetrahydrobiopterinem ( $BH_4$ ). V podmínkách oxidačního stresu převládá oxidovaná forma kofaktoru dihydrobiopterinu ( $BH_2$ ) nad redukovanou formou  $BH_4$ . V přítomnosti  $BH_2$  nedochází k spojení dvou podjednotek NO syntázy (rozpojení - uncoupling). Samostatné (rozdvojené) podjednotky NO syntázy produkují superoxid (Vasquez-Vivar et al. 1998; Crabtree et al. 2009).

Přímé měření volných radikálů v biologických systémech je relativně obtížné, je dané fyzikálně – chemickými vlastnostmi volných radikálů a kompartmentalizací jejich produkce i účinku. Důležitým faktorem je též to, že zatímco v nízké koncentraci často působí jako autokrinní (i parakrinní) regulační působky,

v koncentracích větších poškozují buněčné membrány a modifikují jak nukleové kyseliny tak proteiny i lipidy. Účinky regulační i poškozující se mohou překrývat a mohou být odlišné v různých kompartmentech buňky. Stanovení koncentrace volných radikálů v extracelulárním prostoru či různé formy odhadu „antioxidační aktivity“ mají proto omezený význam a složitou interpretaci. Často používaným přístupem je sledování biologického efektu podání látek s antioxidační aktivitou.

V průběhu působení hypoxie v plicní cirkulaci hraje důležitou roli zvýšení produkce superoxidu. Vysoce biologicky aktivní superoxid se v organismu mění na méně reaktivní peroxid vodíku a kyslík enzymem superoxid dismutáza (SOD), což je substrátem indukovatelný mechanismus (McCord and Fridovich 1969). V savcích buňkách se nacházejí dva typy SOD, rozdělené podle kovů v jejich aktivním centru a také podle subcelulární lokalizace: Cu,Zn-SOD se nachází preferenčně v cytoplasmě, Mn-SOD naopak v mitochondriální matrix. Působením chronické hypoxie se zvyšuje aktivita mitochondriální SOD, což také nepřímo ukazuje na předpokládaný zdroj superoxidu. Již po třech hodinách expozice hypoxii začíná být detekovatelné zvýšení aktivity Mn-SOD, její maximální aktivita byla prokázána v průběhu prvního dne expozice hypoxii (Hampl and Herget 2000). Hypotéza o roli ROS při HPH byla poprvé potvrzena experimentálním zvýšením antioxidační aktivity podáváním dimetylyurey pokusným potkanům v hypoxii: došlo k zmírnění rozvoje HPH a také zmenšení strukturální remodelace plicních cév (Langleben et al. 1989). Následně byly použity stejně účinné, ale lépe snášené antioxidanty, působící jak extracelulárně (Lachmanova et al. 2005) tak intracelulárně (Elmedal et al. 2004; Chovanec et al. 2008). Tyto výsledky byly potvrzeny i přímým měřením produkce peroxidového radikálu (kapalinová chromatografie), kdy podání N-acetylcysteinu způsobilo zmírnění rozvoje HPH (Hoshikawa et al. 2001).

Cílovým místem působení oxidačního stresu, vyvolaného chronickou hypoxií, se zdá být kolagen v extracelulární matrix periferních plicních arteriol. Působením hypoxie se zvyšuje kolagenolytická aktivita v této části plicního řečiště a hromadí se charakteristické štěpy pojivových bílkovin (Novotna and Herget 1998; Herget et al. 1999). Je prokázáno, že tyto kolagenové štěpy stimulují mezenchymální proliferaci a tím vedou k strukturální remodelaci plicních periferních arteriol (Gardi et al. 1990; Bačáková et al. 1997). Kolagenolýza (i HPH) se inhibuje antioxidantem N-acetyl-cysteinem (Herget et al. 1999). Nejpravděpodobnější mechanismus účinku ROS na strukturální remodelaci není přímý, ale zřejmě souvisí s interakcí ROS a NO.

Interakcí superoxidu a NO vzniká peroxynitrit (Huie and Padmaja 1993). Peroxynitrit není volný kyslíkový radikál, ale je také vysoce reaktivní a na rozdíl od radikálů relativně stabilní molekula s relativně dlouhým poločasem rozpadu. Ve vodním roztoku je v rovnováze se svým konjugátem, slabou kyselinou peroxynitritovou, která má vlastnosti podobné hydroxylovému radikálu (zvýrazněné v kyselém prostředí Muijsers et al. 1997). Peroxynitrit způsobuje nitraci tyrozinových zbytků bílkovin a tím je schopen proteiny poškozovat (tímto způsobem je možné peroxynitrit také stanovit) (Beckman 1996). Významnost peroxynitritu byla opakovaně prokázána působením hyperkapnie, kdy oxid uhličitý, navázáním na molekulu peroxynitritu sníží jeho poločas rozpadu a tím působí k snížení jeho toxicity. Tyto změny vedou k zmírnění HPH (Belik et al. 2009; Chovanec et al. 2009). Zdrojem intersticiálních metaloproteináz, které se pomocí radikálů aktivují, jsou žírné buňky (Vajner et al. 2006; Maxova et al. 2008). Použitím inhibitoru degranulace žírných buněk, kromoglykátu disodného nebo samotného specifického inhibitoru metaloproteináz, Batistamat, došlo v obou případech k redukci plicních cévních změn, vyvolaných chronickou hypoxií a k omezení rozvoje hypoxické plicní hypertenze (Herget et al. 2003; Banasova et al. 2008).

### ***1.5 Interakce ROS a NO při rozvoji HPH***

Zvýšená produkce ROS, extrémní produkce NO a tvorba peroxynitritu jsou charakteristické pro první dny působení chronické hypoxie. V této době také dochází ke zvyšování plicního arteriálního tlaku (Herget et al. 1978), zahájení strukturální remodelace periferních plicních cév a zvyšováním plazmatické koncentrace nitrotyrozinu (Herget et al. 2000). Blokáda rozvoje HPH podáním antioxidantů je účinná pokud jsou antioxidanty podány v průběhu prvního týdne expozice hypoxií. Aplikace antioxidantů v průběhu rozvinuté a stabilizované HPH (po druhém nebo v třetím týdnu expozice potkanů hypoxií) efektivní není (Lachmanova et al. 2005; Chovanec et al. 2008). Tyto výsledky potvrzují hypotézu, že na začátku expozice hypoxií dochází k největší produkci volných kyslíkových radikálů a nejvyšší produkci peroxynitritu, spojených se vzestupem plicního arteriálního tlaku. V průběhu dalšího působení chronické hypoxie (od druhého týdne) tyto změny u

potkanů ustávají. Hypotéza byla potvrzena přímým měřením produkce radikálů v průběhu prvního ev. druhého týdne expozice chronické hypoxii (Hoshikawa et al. 1995; Hoshikawa et al. 2001). V období, kdy působí chronická hypoxie, ale tlak v plicnici se již nemění, tj. zhruba od druhého týdne expozice, nejsou prokazatelné ani známky progredujícího oxidačního poškození plicní cirkulace (obrázek č. 1). Produkce NO s těmito změnami částečně koreluje, ale jeho působení není jednoduché. Je potvrzeno, že produkce NO se zvyšuje se zvýšenou expresí NOS v hypoxii. Exprese NOS se zvyšuje po několika hodinách až desítkách hodin od začátku hypoxie (Le Cras et al. 1996). Zvýšená exprese NOS koreluje se zvýšenou produkcí ROS a následnou produkcí peroxynitritu a aktivací strukturální remodelace plicních cév. ROS mohou působit rozpojení NOS, ta se pak stává sama zdrojem superoxidu a podílí se na radikálovém poškození (Crabtree et al. 2009). V prvních dnech expozice chronické hypoxii se v homogenátech plicního parenchymu zvyšuje rovněž aktivita iNOS. Množství NO, produkované iNOS, několikanásobně převládá nad množstvím produkovaným nově se aktivující eNOS. Použitím selektivního inhibitoru iNOS (L-NIL) na počátku expozice chronické hypoxii (nikoli po 3 týdnech) byl inhibován rozvoj HPH (Hampl et al. 2006). Klíčová je tedy cesta: hypoxické poškození (ROS) – exprese iNOS – interakce NO a ROS – vazokonstrikce a remodelace prealveolárních cév. Množství exspirovaného NO při HPH souvisí s produkcí NO v plicní cirkulaci a nesouvisí s produkcí v paranasálních sinusech (Lundberg et al. 1995) nebo nosní sliznici (Gerlach et al. 1994; Dillon et al. 1996). Po prvním týdnu expozice chronické hypoxii je za zvýšenou produkci NO zodpovědná eNOS.

Zatím není jasné, zda zvýšená produkce NO je příčina nebo důsledek působení chronické hypoxie. Existují práce, kde zvýšená produkce NO může být vyvolána zvýšeným střížným napětím (shear stress) plicních cév při vazokonstrikci a to bez působení hypoxie (Everett et al. 1998).

## 2. CÍLE PRÁCE

### 2.1 Pokus č.1

#### 2.1.1 Úvod a hypotéza:

Chronická hypoxie je u lidí vyvolaná jak respirační insuficiencí tak dýcháním vzduchu s nízkou koncentrací kyslíku. V studiích vyšetřujících zdravé lidi žijící ve vysoké nadmořské výšce porovnávaných s pacienty trpících chronickou obstrukční bronchopulmonální nemocí žijící v nízké nadmořské výšce měly obě skupiny porovnatelnou hodnotu saturace periferní krve přibližně 80%, ale druhá skupina byla vystavena významně větší hyperkapnii. Skutečnost, že hyperkapnie částečně brání rozvoji hypoxické plicní hypertenze byla potvrzena v minulosti i experimentálně na laboratorních potkanech.

Cílem této studie bylo testovat hypotézu zda působení chronické hyperkapnie zmírní oxidační poškození periferních plicních arteriol způsobené chronickou hypoxií. Výsledky této studie byly zveřejněny v publikaci č.1.

#### 2.1.2 Použitá metodika:

Studie byla provedena na dospělých samcích laboratorních potkanů kmene Wistar. Působení normobarické chronické hypoxie ( $Fi_{O_2}$  - 10%) ev. normobarické chronické hypoxie ( $Fi_{O_2}$  - 10%) s chronickou hyperkapnií ( $Fi_{CO_2}$  - 5%) bylo indukováno v hypoxické komoře po dobu 3 týdnů (experiment A) a po dobu 4 dní (experiment B).

V experimentu A jsme měřili střední krevní tlak v plicnici u živých zvířat, hmotnost srdce, % remodelovaných periferních plicních arteriol, minutový srdeční výdej, hematokrit, pigmenty podobné lipofuscinu a tělesnou hmotnost. V experimentu B jsme měřili množství vydechovaného NO, plasmatickou koncentraci NOx, koncentraci nitrotyrozinu a přítomnost specifických kolagenových štěpů v periferních plicních arteriolách.



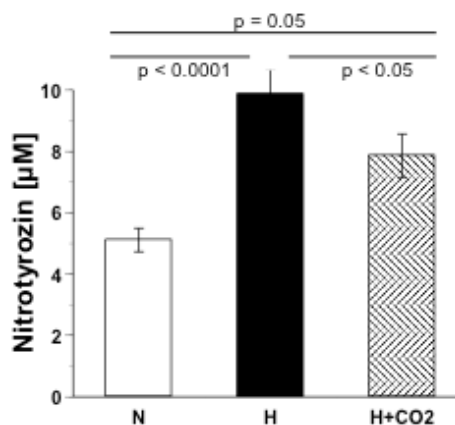
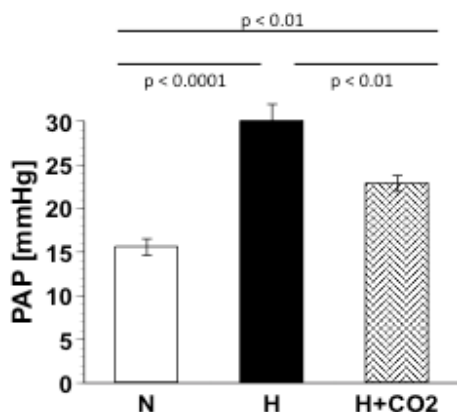
### 2.1.3 Výsledky:

V experimentu A byly všechny měřené parametry v skupině vystavené chronické hypoxii s hyperkapnií nižší oproti skupině vystavené chronické hypoxii bez hyperkapnie kromě hodnoty hematokritu a minutového srdečního výdeje, které se oproti této skupině nelišily (obrázek č. 5).

V experimentu B bylo produkované množství NO (ve vydechovaném vzduchu i plasmě) výrazně větší v skupině vystavené chronické hypoxii s hyperkapnií v porovnání se skupinou vystavenou chronické hypoxii bez hyperkapnie. Hodnoty oxidačního poškození periferních plicních arteriol (koncentrace nitrotyrozinu a specifické kolagenové štěpy) byly ve skupině vystavené chronické hypoxii s hyperkapnií výrazně nižší oproti skupině vystavené chronické hypoxii bez hyperkapnie (obrázek č. 6).

Obrázek č. 5: PAP u zvířat vystavených chronické hypoxii ev. chronické hypoxii s hyperkapnií po dobu 3 týdnů.

N – normoxické kontroly, H – hypoxické kontroly, H+CO<sub>2</sub> – zvířata vystavena chronické hypoxii s hyperkapnií



Obrázek č. 6: **Plazmatická koncentrace nitrotyrozinu u zvířat vystavených chronické hypoxii ev. chronické hypoxii s hyperkapnií po dobu 4 dnů.**

N – normoxické kontroly, H – hypoxické kontroly, H+CO<sub>2</sub> – zvířata vystavena chronické hypoxii s hyperkapnií

#### 2.1.4 Diskuse k publikaci:

Hlavním objevem této práce je důkaz, že zmírnění rozvoje hypoxické plicní hypertenze hyperkapnií je způsobeno přímým zmenšením oxidačního poškození periferních plicních arteriol působením hyperkapnie. Nejpravděpodobnější mechanismus této vlastnosti hyperkapnie je indukce tvorby nitrosoperoxokarbonátu. Tento vzniká vzájemnou interakcí CO<sub>2</sub> a peroxynitritu, což významně snižuje biologický poločas peroxynitritu. Zkrácená doba difuze peroxynitritu vede k menší biologické efektivitě této molekuly, což vede k menšímu oxidačnímu poškození periferních plicních arteriol. Ověřením této hypotézy se uvedená práce nezabývala. Zmenšení rozvoje hypoxické plicní hypertenze, v tomto pokusu, nebylo způsobeno srdečním selháním.

Uvedená studie byla rozdělena na experiment A a experiment B. V experimentu A byla vyšetřovaná zvířata vystavena působení chronické hypoxii ev. chronické hypoxii s hyperkapnií po dobu 3 týdnů k prokázání změn plicního řečiště přetrvávajících dlouhodobě (zvýšený tlak v plicnici, remodelace plicních periferních arteriol, tělesná hmotnost...). V experimentu B byla vyšetřovaná zvířata vystavena uvedeným podmínkám po dobu 4 dní. Tato část pokusu byla zaměřena na měření změn v průběhu prvního týdne rozvoje hypoxické plicní hypertenze, kdy je oxidační poškození plicních cév největší, viz kapitolu Úvod.

## **2.2 Pokus č.2**

### *2.2.1 Úvod a hypotéza:*

V současné době je léčba plicní hypertenze založena na podávání třech skupin látek: a.) omezení účinku endotelinu, aplikací inhibitorů jeho membránových receptorů; b.) zvýraznění vazodilatačních účinků prostacyklinu, aplikací agonistů jeho membránových receptorů; c.) prodloužení účinnosti NO, intracelulární inhibicí hydrolýzy cGMP zablokováním specifické fosfodiesterázy; a jejich vzájemných kombinací. Z uvedených působků; endotelin, prostacyklin, NO; pouze produkce NO významně funkčně souvisí s adaptací plicní cirkulace na zvýšený krevní tlak. Význam zvýšené produkce endotelinu a snížené produkce prostacyklinu při rozvinuté plicní hypertenzi se v současné době považuje spíše za následek než důvod poškození plicních cév (Stewart et al. 1991). Tvorba NO úzce souvisí s hladinou L-argininu jako substrátu NOS a aktivitou enzymu PDE, vše viz kapitola Úvod. V minulosti bylo experimentálně prokázáno, že samostatné podání L-argininu nebo samostatné podání specifického inhibitoru PDE (sildenafil) výrazně sníží rozvoj hypoxické plicní hypertenze.

Cílem této studie bylo testovat hypotézu zda podání L-argininu v kombinaci se sildenafilem je při inhibici rozvoje hypoxické plicní hypertenze efektivnější než podání uvedených látek samostatně. Výsledky této studie jsou přijaty k publikaci (publikace č.2 této obhajoby).

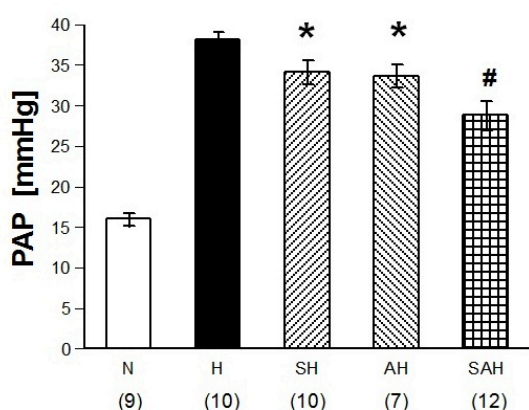
### *2.2.2 Použitá metodika:*

Studie byla provedena na dospělých samcích laboratorních potkanů kmene Wistar. Vyšetřovaná zvířata byla vystavena normobarické chronické hypoxii ( $F_{iO_2}$  - 10%) po dobu 3 týdnů. Zkoumané léčiva; L-arginin, sildenafil a jejich kombinace; byly aplikovány vyšetřovaným zvířatům po celou dobu expozice chronické hypoxii.

Měřili jsme střední krevní tlak v plicnici u živých zvířat, % remodelovaných periferních plicních arteriol, hmotnost srdce, minutový srdeční výdej, hematokrit, tělesnou hmotnost, koncentraci NOx a cGMP v plazmě.

### 2.2.3 Výsledky:

Hodnoty tělesné hmotnosti, hematokritu a minutového srdečního výdeje se v skupinách vystavených hypoxii navzájem nelišily. Koncentrace NOx a cGMP v plazmě byla v skupině vystavené chronické hypoxii a léčené kombinací podávaných látek významně vyšší oproti skupině vystavené chronické hypoxii bez léčby. Hodnoty středního krevního tlaku v plicnici (obrázek č. 7), procento remodelovaných periferních plicních arteriol (obrázek č. 8) a hypertrofie pravé srdeční komory byly významně menší v skupině léčené kombinací podávaných látek oproti hypoxickým kontrolám. První dva měřené parametry byly dokonce významně menší v této skupině v porovnání se skupinami léčenými látkami jednotlivě.

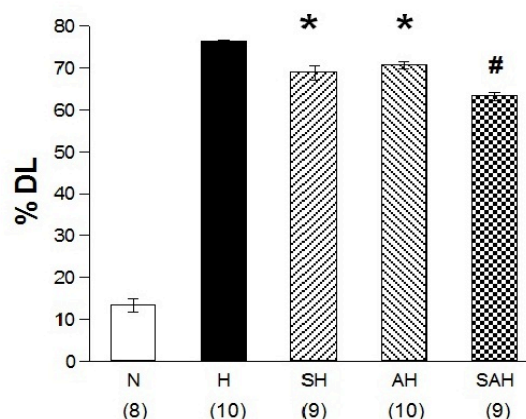


Obrázek č. 7: PAP u zvířat vystavených působení chronické hypoxie.

N – normoxické kontroly, H – hypoxické kontroly, SH – skupina vystavena chronické hypoxii s podáváním sildenafilu, AH – skupina vystavena chronické hypoxii s podáváním L-argininu, SAH – skupina vystavena hypoxii s podáváním kombinace L-argininu a sildenafilu.

\* -  $P < 0.05$  vs. skupině H

# -  $P < 0.0001$  vs. skupině H a  $P < 0.05$  vs. skupinám SH a AH



Obrázek č. 8: Procento remodelovaných preriferních plicních arteriol („double laminated“ vessels) u zvířat vystavených působení chronické hypoxie.

N – normoxické kontroly, H – hypoxické kontroly, SH – skupina vystavena chronické hypoxii s podáváním sildenafilu, AH – skupina vystavena chronické hypoxii s podáváním L-argininu, SAH – skupina vystavena hypoxii s podáváním kombinace L-argininu a sildenafilu.

\* -  $P < 0.001$  vs. skupině H

#### *2.2.4 Diskuse k publikaci:*

Hlavním objevem této práce je, že substrát NO syntázy (L-arginin) a inhibitor PDE (sildenafil) podané současně jsou účinnější při omezení rozvoje hypoxické plicní hypertenze, než tyto látky podané samostatně. Prokázali jsme, že tento efekt pravděpodobně souvisí s produkcí NO. Zmenšení rozvoje hypoxické plicní hypertenze, ve všech léčených skupinách, v tomto pokusu, nebylo způsobeno srdečním selháním.

V uvedené práci jsme záměrně zvolili minimální, ale ještě účinné dávky vyšetřovaných látek k lepšímu odhalení aditivního účinku podání uvedených látek v kombinaci (viz článek č.2).

### **3. ZÁVĚR**

- hyperkapnie sníží oxidační poškození periferních plicních arteriol při působení chronické hypoxie a tím zmenší rozvoj hypoxické plicní hypertenze. Tento efekt pravděpodobně souvisí se sníženou biologickou dostupností peroxynitritu.
- kombinace L-argininu, jako prekurzoru NOS a inhibitoru PDE (sildenafil) je při omezení rozvoje hypoxické plicní hypertenze účinnější než podání uvedených látek samostatně.

## 4. SOUHRN

Hyperkapnii je možné terapeuticky využít v léčbě kriticky nemocných se sklonem k hypoxii (kardio – pulmonální selhání), jako prevenci rozvoje plicní hypertenze. Tato práce vysvětluje klinické pozorování kdy pacienti s chronickou obstrukční plicní nemocí s významnou obstrukcí dýchacích cest, kteří jsou vystaveni účinku hypoxie a zároveň účinku hyperkapnie, mají méně rozvinutou plicní hypertenzi oproti zdravým lidem žijícím ve vysoké nadmořské výšce vystavených porovnatelné hypoxii bez hyperkapnie.

Mortalita pacientů s plicní hypertenzí úzce souvisí s pravostrannými srdečními hemodynamickými parametry (střední tlak v plicnici, krevní tlak v pravé srdeční komoře, srdeční index) (D'Alonzo et al. 1991). Současná doporučená léčba plicní hypertenze (inhibitory endotelinových receptorů, agonisty prostacyklinových receptorů, inhibitory fostodiesteráty) je extrémně drahá, ale málo účinná (první dva přístupy). Terapie prezentována v naší práci (pokus č.2) je v porovnání se současnou léčbou plicní hypertenze levná a hemodynamicky účinná. V budoucnosti by mohla představovat účinnou alternativu k současnému přístupu.

## 5. SUMMARY

Hypercapnia could be used in the treatment of critically ill patients with chronic hypoxia (cardio – pulmonary failure) as a prevention against the development of hypoxic pulmonary hypertension. This work showed the reason based on the observed difference between patients with chronic obstructive pulmonary disease and high altitude dwellers. Both groups have similar levels of oxygen saturation of haemoglobin, high altitude residents have no hypercapnia compared to patients with chronic obstructive pulmonary disease but hypercapnic sea level patients have less severe lung hypertension than mountain residents.

Mortality of people with diagnosed pulmonary arterial hypertension is closely associated with right ventricle hemodynamic function (pulmonary arterial pressure, right atrial pressure and cardiac index). Recently, the therapy that has been used for pulmonary arterial hypertension has consisted of three main targets; firstly: endothelin receptor blockers, secondly: prostacycline and its analogues, thirdly: PDE-5 inhibitors in order to increase the concentration of endogenous NO and its mutual combination. Unfortunately, it is clear that the recent clinical therapy of pulmonary arterial hypertension is extremely expensive, with minimal or no effect on right ventricle hemodynamic function. In fact, the significance of the increase of prostacycline and endothelin throughout the duration of pulmonary arterial hypertension is a consequence rather than a cause of pulmonary arterial hypertension. The treatment presented in the recent work could play an important role in the treatment of pulmonary arterial hypertension in the future.



## 6. VLASTNÍ PUBLIKACE K TÉMATU

- 1.) Chovanec M, Novotna J, Wilhelm J, Hampl V, Vizek M, Herget J: Hypercapnia attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting lung radical injury. *Physiological Research* 58 (Suppl. 2): S79-85, 2009 (IF 1.555)
- 2.) Al-Hiti H, Chovanec M, Melenovsky V, Vajnerova O, Banasova A, Kautzner J, Herget J: L-Arginine in combination with sildenafil potentiates the attenuation of hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Physiological Research* in-press (IF 1.555)
- 3.) Herget J and Chovanec M.: Isolated perfused murine lung: A well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discovery Today: Disease Models* 7: 2010, No 3-4, 131-135 (IF 6.828)
- 4.) Chovanec, M: Vztah volných kyslíkových radikálů a oxidu dusnatého při vzniku hypoxické plicní hypertenze. *Československá Fyziologie*, in-press

### ABSTRAKTA

- 1.) INTERACTION OF NITRIC OXIDE AND REACTIVE OXYGEN SPECIES DURING DEVELOPMENT OF THE HYPOXIC PULMONARY HYPERTENSION *Acta Physiologica* 2007, Volume 191, Supplement 658, P34
- 2.) Interaction of nitric oxide and reactive oxygen species in the development of hypoxic pulmonary hypertension *The FASEB Journal*. 2008.doc;22,1209.8
- 3.) Superoxide – NO interaction plays an important role in inhibition of hypoxic pulmonary hypertension by hypercapnia *The FASEB Journal*, 2009, 23, 770.8

4.) Model of pulmonary hypertension induced by reversible pressure-overloaded left heart failure in rats The FASEB Journal, 2012; 26, 873.23

## **7. SEZNAM LITERATURY**

1. ADNOT S, RAFFESTIN B, EDDAHIBI S, BRAQUET P, CHABRIER PE: Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. J Clin Invest 87:1991 155-162.
2. ARCHER SL, HUANG JM, HAMPL V, NELSON DP, SHULTZ PJ, WEIR EK: Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 91:1994 7583-7587.
3. BAČÁKOVÁ L, WILHELM J, HERGET J, NOVOTNÁ J, ECKHART A: Oxidized collagen stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells. Exper Molec Pathol 64:1997 185-194.
4. BANASOVA A, MAXOVA H, HAMPL V, VIZEK M, POVYSILOVA V, NOVOTNA J, VAJNEROVA O, HNILICKOVA O, HERGET J: Prevention of mast cell degranulation by disodium cromoglycate attenuates the development of hypoxic pulmonary hypertension in rats exposed to chronic hypoxia. Respiration 76:2008 102-107.
5. BARER GR: Active control of the pulmonary circulation. In: Pulmonary Circulation in Health and Disease. G CUMMING, G BONSIGNORE (eds), Plenum Press, 1979, pp 81 - 99.
6. BECKMAN JS: Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. Chem Res Toxicol 9:1996 836-844.
7. BELIK J, STEVENS D, PAN J, SHEHNAZ D, IBRAHIM C, KANTORES C, IVANOVSKA J, GASEMANN H, JANKOV RP: Chronic hypercapnia downregulates arginase expression and activity and increases pulmonary arterial smooth muscle relaxation in the newborn rat. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 297:2009 L777-784.
8. BRANER DA, FINEMAN JR, CHANG R, SOIFER SJ: M&B 22948, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, is a pulmonary vasodilator in lambs. Am J Physiol 264:1993 H252-258.
9. COHEN AH, HANSON K, MORRIS K, FOUTY B, MCMURTY IF, CLARKE W, RODMAN DM: Inhibition of cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase selectively vasodilates the pulmonary circulation in chronically hypoxic rats. J Clin Invest 97:1996 172-179.
10. CRABTREE MJ, TATHAM AL, AL-WAKEEL Y, WARRICK N, HALE AB, CAI S, CHANNON KM, ALP NJ: Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry

and biopterin redox status: insights from cells with tet-regulated GTP cyclohydrolase I expression. *J Biol Chem* 284:2009 1136-1144.

11. D'ALONZO GE, BARST RJ, AYRES SM, BERGOFKY EH, BRUNDAGE BH, DETRE KM, FISHMAN AP, GOLDRING RM, GROVES BM, KERNIS JT, ET AL.: Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* **115**: 343-349, 1991.

12. DAWSON CA, RICKABY DA, LINEHAN JH, BRONIKOWSKI TA: Distributions of vascular volume and compliance in the lung. *J Appl Physiol* 64:1988 266-273.

13. DILLON WC, HAMPL V, SHULTZ PJ, RUBINS JB, ARCHER SL: Origins of breath nitric oxide in humans. *Chest* 110:1996 930-938.

14. ELMEDAL B, DE DAM MY, MULVANY MJ, SIMONSEN U: The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats. *Br J Pharmacol* 141:2004 105-113.

15. EVERETT AD, LE CRAS TD, XUE C, JOHNS RA: eNOS expression is not altered in pulmonary vascular remodeling due to increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol* 274:1998 L1058-1065.

16. FAGAN KA, OKA M, BAUER NR, GEBB SA, IVY DD, MORRIS KG, MCMURTRY IF: Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:2004 L656-664.

17. GALIE N, HOEPER MM, HUMBERT M, TORBICKI A, VACHIERY JL, BARBERA JA, BEGHETTI M, CORRIS P, GAINE S, GIBBS JS, GOMEZ-SANCHEZ MA, JONDEAU G, KLEPETKO W, OPITZ C, PEACOCK A, RUBIN L, ZELLWEGER M, SIMONNEAU G, VAHANIAN A, AURICCHIO A, BAX J, CECONI C, DEAN V, FILIPPATOS G, FUNCK-BRENTANO C, HOBBS R, KEARNEY P, McDONAGH T, MCGREGOR K, POPESCU BA, REINER Z, SECHTEM U, SIRNES PA, TENDERA M, VARDAS P, WIDIMSKY P, SECHTEM U, AL ATTAR N, ANDREOTTI F, ASCHERMANN M, ASTEGGIANO R, BENZA R, BERGER R, BONNET D, DELCROIX M, HOWARD L, KITSIOU AN, LANG I, MAGGIONI A, NIELSEN-KUDSK JE, PARK M, PERRONE-FILARDI P, PRICE S, DOMENECH MT, VONK-NOORDEGRAAF A, ZAMORANO JL: Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 30:2009 2493-2537.

18. GARDI C, PACINI A, DE SANTI MM, CALZONI P, VITI A, CORRADESCHI F, LUNGARELLA G: Development of interstitial lung fibrosis by long-term treatment with collagen breakdown products in rabbits. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 68:1990 235-250.

19. GERLACH H, ROSSAINT R, PAPPERT D, KNORR M, FALKE KJ: Autoinhalation of nitric oxide after endogenous synthesis in nasopharynx. *Lancet* 343:1994 518-519.

20. HAMPL V, ARCHER SL, NELSON DP, WEIR EK: Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 75:1993 1748-1757.

21. HAMPL V, BIBOVA J, BANASOVA A, UHLIK J, MIKOVA D, HNILICKOVA O, LACHMANOVA V, HERGET J: Pulmonary vascular iNOS induction participates in the

onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:2006 L11-20.

22. HAMPL V, CORNFIELD DN, COWAN NJ, ARCHER SL: Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *Eur Respir J* 8:1995 515-522.

23. HAMPL V, HERGET J: Pulmonary Circulation. In: *Biomechanics of the Cardiovascular System*. ŠRÁMEK B. BO., VALENTA J., KLIMEŠ F. (eds), Czech Technical University Press, Prague, 1995, pp 327 - 339.

24. HAMPL V, HERGET J: Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* 80:2000 1337-1372.

25. HERGET J, NOVOTNÁ J, BÍBOVÁ J, HAMPL V, POVÝŠILOVÁ V: Hypoxic pulmonary hypertension in rats is inhibited by antioxidant, N-acetyl cysteine. *Physiol Res* 48:1999 54P.

26. HERGET J, NOVOTNA J, BIBOVA J, POVYSILOVA V, VANKOVA M, HAMPL V: Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:2003 L199-208.

27. HERGET J, SUGGETT AJ, LEACH E, BARER GR: Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax* 33:1978 468-473.

28. HERGET J, WILHELM J, NOVOTNA J, ECKHARDT A, VYTASEK R, MRAZKOVA L, OSTADAL M: A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res* 49:2000 493-501.

29. HISLOP A, REID L: Normal structure and dimensions of the pulmonary arteries in the rat. *J Anat* 125:1978 71-83.

30. HOSHIKAWA Y, ONO S, SUZUKI S, TANITA T, CHIDA M, SONG C, NODA M, TABATA T, VOELKEL NF, FUJIMURA S: Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J Appl Physiol* 90:2001 1299-1306.

31. HOSHIKAWA Y, ONO S, TANITA T, SAKUMA T, NODA M, TABATA T, UEDA S, ASHINO Y, FUJIMURA S: [Contribution of oxidative stress to pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 33:1995 1168-1173.

32. HOWELL K, OOI H, PRESTON R, MCLOUGHLIN P: Structural basis of hypoxic pulmonary hypertension: the modifying effect of chronic hypercapnia. *Exp Physiol* 89:2004 66-72.

33. HUIE RE, PADMAJA S: The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18:1993 195-199.

34. CHANG SW, STELZNER TJ, WEIL JV, VOELKEL NF: Hypoxia increases plasma glutathione disulfide in rats. *Lung* 167:1989 269-276.

35. CHOVANEC M, HNILICKOVA O, SMOLKOVA P, HERGET J: Interaction of nitric oxide and reactive oxygen species in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *FASEB J* 22:2008 [ABSTRACT] 1209.1208-.

36. CHOVANEC M, NOVOTNA J, WILHELM J, HAMPL V, VIZEK M, HERGET J: Hypercapnia attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting lung radical injury. *Physiol Rev* 58:2009 S79-S85
37. IGNARRO LJ. 2000. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology. Firts Edition.ed. Academic Press. 1017 pp.
38. ISAACSON TC, HAMPL V, WEIR EK, NELSON DP, ARCHER SL: Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* 76:1994 933-940.
39. KNOWLES RG, MONCADA S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 ( Pt 2):1994 249-258.
40. LACHMANOVA V, HNILICKOVA O, POVYSILOVA V, HAMPL V, HERGET J: N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sci* 77:2005 175-182.
41. LANGLEBEN D, FOX RB, JONES RC, REID LM: Effects of dimethylthiourea on chronic hypoxia-induced pulmonary arterial remodelling and ventricular hypertrophy in rats. *Clin Invest Med* 12:1989 235-240.
42. LE CRAS TD, XUE C, RENGASAMY A, JOHNS RA: Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol* 270:1996 L164-170.
43. LUNDBERG JO, FARKAS-SZALLASI T, WEITZBERG E, RINDER J, LIDHOLM J, ANGGAARD A, HOKFELT T, LUNDBERG JM, ALVING K: High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nat Med* 1:1995 370-373.
44. MAXOVA H, NOVOTNA J, VAJNER L, TOMASOVA H, VYTASEK R, VIZEK M, BACAKOVA L, VALOUSKOVA V, ELIASOVA T, HERGET J: In vitro hypoxia increases production of matrix metalloproteinases and tryptase in isolated rat lung mast cells. *Physiol Res* 57:2008 903-910.
45. MCCORD JM, FRIDOVICH I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:1969 6049-6055.
46. MICHELAKIS E, TYMCHAK W, LIEN D, WEBSTER L, HASHIMOTO K, ARCHER S: Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 105:2002 2398-2403.
47. MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38:1989 1709-1715.
48. MUIJSERS RB, FOLKERTS G, HENRICKS PA, SADEGHI-HASHJIN G, NIJKAMP FP: Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci* 60:1997 1833-1845.
49. MURAD F: Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 78:1986 1-5.
50. NOVOTNA J, HERGET J: Exposure to chronic hypoxia induces qualitative changes of collagen in the walls of peripheral pulmonary arteries. *Life Sci* 62:1998 1-12.
51. PALMER RM, ASHTON DS, MONCADA S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:1988 664-666.

52. PALMER RM, MONCADA S: A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158:1989 348-352.
53. REEVES JT, GROVES BM, TURKEVICH D: The case for treatment of selected patients with primary pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis* 134:1986 342-346.
54. SEBKHI A, STRANGE JW, PHILLIPS SC, WHARTON J, WILKINS MR: Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 107:2003 3230-3235.
55. SOMLYO AP, SOMLYO AV: Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83:2003 1325-1358.
56. STEWART DJ, LEVY RD, CERNACEK P, LANGLEBEN D: Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 114: 464-469, 1991.
57. VAJNER L, VYTASEK R, LACHMANOVA V, UHLIK J, KONRADOVA V, NOVOTNA J, HAMPL V, HERGET J: Acute and chronic hypoxia as well as 7-day recovery from chronic hypoxia affects the distribution of pulmonary mast cells and their MMP-13 expression in rats. *Int J Exp Pathol* 87:2006 383-391.
58. VASQUEZ-VIVAR J, KALYANARAMAN B, MARTASEK P, HOGG N, MASTERS BS, KAROUI H, TORDO P, PRITCHARD KA, JR.: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1998 9220-9225.
59. XUE C, JOHNS RA: Upregulation of nitric oxide synthase correlates temporally with onset of pulmonary vascular remodeling in the hypoxic rat. *Hypertension* 28:1996 743-753.
60. XUE C, RENGASAMY A, LE CRAS TD, KOBERNA PA, DAILEY GC, JOHNS RA: Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia. *Am J Physiol* 267:1994 L667-678.
61. ZIEGLER JW, IVY DD, FOX JJ, KINSELLA JP, CLARKE WR, ABMAN SH: Dipyridamole, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, causes pulmonary vasodilation in the ovine fetus. *Am J Physiol* 269:1995 H473-479.

## **8. Publikace č. 1**

## Hypercapnia Attenuates Hypoxic Pulmonary Hypertension by Inhibiting Lung Radical Injury

M. CHOVANEC<sup>1,4,5</sup>, J. NOVOTNÁ<sup>3,4</sup>, J. WILHELM<sup>3,4</sup>, V. HAMPL<sup>1,4</sup>, M. VÍZEK<sup>2,4</sup>, J. HERGET<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and <sup>2</sup>Department of Pathophysiology, <sup>3</sup>Department of Biochemistry, Second Medical School, Charles University, Prague, <sup>4</sup>Center for Cardiovascular Research, Prague, <sup>5</sup>Cardiology Department, Na Homolce Hospital, Prague, Czech Republic

Received October 9, 2009

Accepted October 30, 2009

### Summary

Chronic lung hypoxia results in hypoxic pulmonary hypertension. Concomitant chronic hypercapnia partly inhibits the effect of hypoxia on pulmonary vasculature. Adult male rats exposed to 3 weeks hypoxia ( $Fi_{O_2}=0.1$ ) combined with hypercapnia ( $Fi_{CO_2}=0.04-0.05$ ) had lower pulmonary arterial blood pressure, increased weight of the right heart ventricle, and less pronounced structural remodeling of the peripheral pulmonary arteries compared with rats exposed only to chronic hypoxia ( $Fi_{O_2}=0.1$ ). According to our hypothesis, hypoxic pulmonary hypertension is triggered by hypoxic injury to the walls of the peripheral pulmonary arteries. Hypercapnia inhibits release of both oxygen radicals and nitric oxide at the beginning of exposure to the hypoxic environment. The plasma concentration of nitrotyrosine, the marker of peroxynitrite activity, is lower in hypoxic rats exposed to hypercapnia than in those exposed to hypoxia alone. Hypercapnia blunts hypoxia-induced collagenolysis in the walls of prealveolar pulmonary arteries. We conclude that hypercapnia inhibits the development of hypoxic pulmonary hypertension by the inhibition of radical injury to the walls of peripheral pulmonary arteries.

### Key words

Chronic hypoxia • Chronic hypercapnia • Pulmonary hypertension • Hypoxic lung injury

### Corresponding author

Milan Chovanec, Department of Physiology, Second Medical School, Charles University, Prague, Plzeňská 221, 150 00 Prague 5, Czech Republic. E-mail: milan.chovanec@lfmotol.cuni.cz

### Introduction

Chronic hypoxia causes hypoxic pulmonary hypertension (HPH) and structural remodeling of pulmonary blood vessels. Chronic lung hypoxia typically results from respiratory insufficiency or from breathing gas with a low oxygen concentration. The major difference between these two alternatives is in lung concentration of carbon dioxide. Whereas respiratory insufficiency in lung disease is most often characterized by hypercapnia and respiratory acidosis, oxygen deprivation in high mountains results in hypocapnia and alkalosis. In lung disease the onset of hypercapnia is an adverse prognostic event. Severity of cor pulmonale, however, was statistically linked with measurements of airway obstruction but not with hypercapnia (Wilkinson *et al.* 1988). In animal experiments, hypercapnia partially inhibited the development of HPH (Ooi *et al.* 2000, Herget *et al.* 2001, Herget *et al.* 2002, Howell *et al.* 2004, Kantores *et al.* 2006). In studies on high altitude dwellers (Canepa *et al.* 1956, Hultgren and Grover 1968) and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Lapp *et al.* 1971, Astin 1972), where both groups have similar levels of oxygen saturation of hemoglobin (~80 %), high altitude residents have  $P_{aCO_2}$  ~31 torr and COPD patients ~46 torr. Hypercapnic sea level patients had less severe lung hypertension (mean pulmonary blood pressure 25 mm Hg) than mountain residents (35 mm Hg).

HPH results from hypoxia-induced radical tissue injury to the walls of peripheral pulmonary arterioles (Hampl and Herget 2000, Herget *et al.* 2000). The

PHYSIOLOGICAL RESEARCH • ISSN 0862-8408 (print) • ISSN 1802-9973 (online)

© 2009 Institute of Physiology v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Fax +420 241 062 164, e-mail: physres@biomed.cas.cz, www.biomed.cas.cz/physiolres



**Table 1.** Body weight (BW), pulmonary artery pressure (PAP), cardiac output (CO), RV/LV+S ratio, DL ratio and plasma nitrotyrosine concentration in rats after 3 weeks exposure to ambient air (N), hypoxia (H) and hypoxia with hypercapnia (H + CO<sub>2</sub>).

Group	BW (g)	PAP (mm Hg)	CO (ml.min <sup>-1</sup> )	RV/LV+S	DL (%)	Nitrotyrosine (μM)
N	415±8*	15.6±0.9*	38.4±4.2	0.252±0.012*	18±2*	6.9±0.6*
H + CO <sub>2</sub>	214±6	22.9±0.9 <sup>+</sup>	38.0±3.3	0.349±0.016 <sup>+</sup>	26±4 <sup>+</sup>	11.8±1.4 <sup>+</sup>
H	243±8	30.0±1.9	27.6±2.6	0.539±0.021	38±3	17.7±2.7

PAP – pulmonary arterial mean blood pressure, CO – cardiac output, RV/LV+S – ratio of right ventricular heart weight to the sum of weights of left heart ventricle and septum, DL – ratio of hypertrophied (double laminated) peripheral pulmonary arteries and total number of peripheral pulmonary arteries on section of both lungs. \* P<0.05 between groups N and H + CO<sub>2</sub>, <sup>+</sup> P<0.05 between groups H and H + CO<sub>2</sub>.

initiation of HPH is characterized by the increase in production of NO and oxygen radicals (reactive oxygen species, ROS) (Lachmanová *et al.* 2005, Hampl *et al.* 2006). We hypothesize that hypercapnia restricts the HPH by inhibition of radical damage in the walls of the prealveolar pulmonary vessels. In this study on chronically hypoxic and chronically hypoxic and hypercapnic rats we characterized the developed pulmonary hypertension and analyzed the relation of hypercapnia to hypoxia-induced radical injury of peripheral pulmonary arteries.

## Methods

### Exposure to chronic hypoxia and hypercapnia

Experiments on three groups of adult male Wistar rats were performed in accordance with the European Community and NIH guidelines for using experimental animals. All procedures were approved by our institution's Animal Studies Committee.

The first group (group H) was exposed to chronic hypoxia in an isobaric hypoxic chamber (F<sub>IO2</sub>=0.1). CO<sub>2</sub> was completely reabsorbed in closed circuit by KOH and soda lime (Hampl and Herget 1990). In the second group (H + CO<sub>2</sub>), rats were exposed to hypoxia (F<sub>IO2</sub>=0.1) and hypercapnia (F<sub>ICO2</sub>=0.04-0.05). The increase in carbon dioxide concentration was achieved by bypassing the KOH absorber. The concentration of CO<sub>2</sub> was continuously monitored. The third group of rats (N) lived in atmospheric air. Rats were exposed to hypoxia or to hypoxia and hypercapnia for 3 weeks (study A) or 4 days (study B).

Study A was designed to investigate the effect of hypercapnia on the development of hypoxic pulmonary hypertension. Study B was focused on the effects of

hypercapnia on ROS and NO production in early hypoxia-induced pulmonary vascular injury and on resulting metabolic changes in the walls of the peripheral pulmonary arteries.

After 3 weeks of exposure (study A) the rats were anesthetized with thiopental (30 mg/kg b.w. i.p.). In closed chest rats we measured the mean pulmonary arterial blood pressure (PAP) (Herget and Paleček 1972) and, after thoracotomy, the cardiac output (CO) by ultrasonic flow probe (Hampl *et al.* 2003). Hematocrit, plasma nitrotyrosine concentration (Herget *et al.* 2000) and concentration of lipofuscin-like pigments (lipid peroxidation endproducts) in erythrocyte membranes (Wilhelm and Herget 1999) were measured in samples of arterial blood. The heart was dissected and weighed in parts (Herget *et al.* 1978). The presence of chronic hypoxia-induced structural remodeling of peripheral pulmonary arteries was assessed by a quantitative histological method (Herget *et al.* 1978).

In rats exposed to 4 days hypoxia (study B) we measured the amount of exhaled NO in awake rats. After thiopental anesthesia, plasma concentration of NO plus its oxidation products (NOx) and nitrotyrosine concentration were measured by methods described elsewhere (Hampl *et al.* 2006). Following thoracotomy the lungs were exposed, cooled with ice and peripheral pulmonary arteries were dissected. From 20-25 vascular samples obtained from individual rats we isolated collagen proteins by limited pepsin digestion and individual collagen fractions were analyzed by gel SDS electrophoresis (Novotná and Herget 1998).

### Statistical analysis

Results were evaluated by ANOVA with Fischer *post-hoc* test. Values of p<0.05 were considered

significant. The results are presented as means  $\pm$  SEM.

## Results

### Study A – 3 weeks of exposure

Ten rats were included in each experimental group. All rats in groups N and H survived 3 weeks of experiment, one rat of the group H + CO<sub>2</sub> died after one week of exposure. The groups H and H + CO<sub>2</sub> had significantly lower body weight than normoxic controls N. The presence of high CO<sub>2</sub> concentration in inspired air significantly inhibited the development of HPH. Rats of the H + CO<sub>2</sub> group had significantly lower mean pulmonary arterial blood pressure, decreased right to left heart weight index and less muscularized peripheral pulmonary arteries than hypoxic rats with no hypercapnia (group H). Cardiac output did not differ between the groups. Hypercapnia, however, did not fully prevent the HPH and all indices of HPH were still significantly different from normoxic controls (Table 1). The values of hematocrit in groups exposed to hypoxia did not differ (H 74 $\pm$ 2 %, H+CO<sub>2</sub> 73 $\pm$ 3 %) and were significantly higher than in normoxic controls (N 54 $\pm$ 3 %,  $P < 0.001$ ). The concentration of lipofuscin-like fluorescent pigments was significantly lower in the group H + CO<sub>2</sub> than in the group H (Fig. 1) and did not differ from normoxic controls.

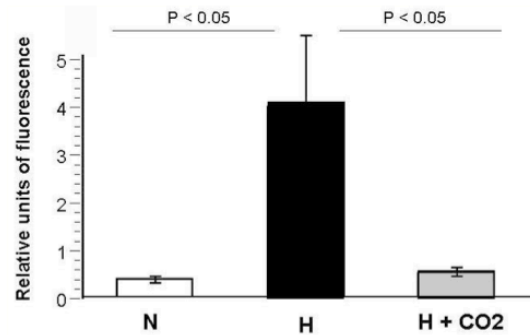
### Study B – 4 days of exposure

Four days exposure to hypoxia increased significantly the amount of NO in exhaled air. This increase was significantly lower in the group exposed to hypoxia and hypercapnia. Similarly the increase in plasma concentration of NOx and serum concentration of nitrotyrosine was significantly lower in group H + CO<sub>2</sub> than in group H (Fig. 2).

Exposure to hypoxia induced collagenolysis in the walls of peripheral pulmonary arteries which resulted in the presence of typical low molecular weight collagen fragments (Novotná and Herget 1998). This hypoxia-induced collagen cleavage was less prominent in the group H + CO<sub>2</sub> than in the group H (Figs 3 and 4). Analysis of collagenous proteins was made in 7 rats of groups H and H + CO<sub>2</sub> and in 6 rats of group N.

## Discussion

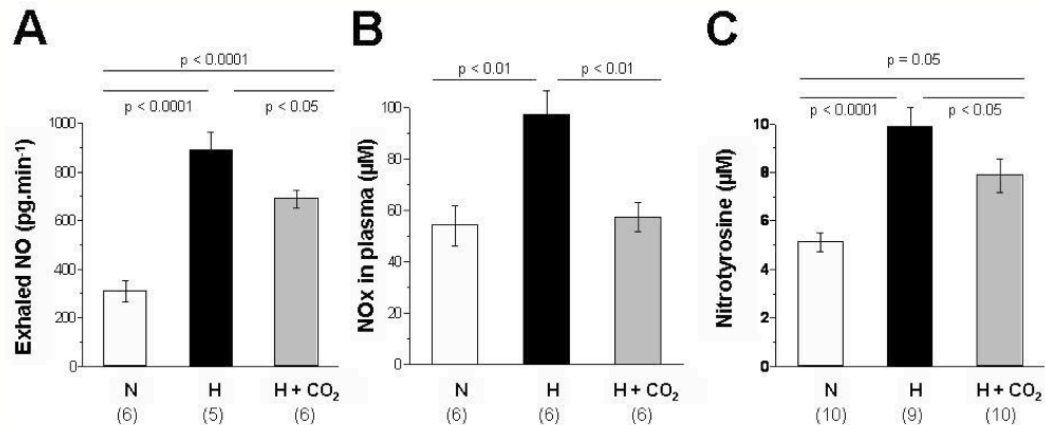
The main finding of this study is that hypercapnia inhibits the development of HPH by interaction with radical tissue injury in the walls of



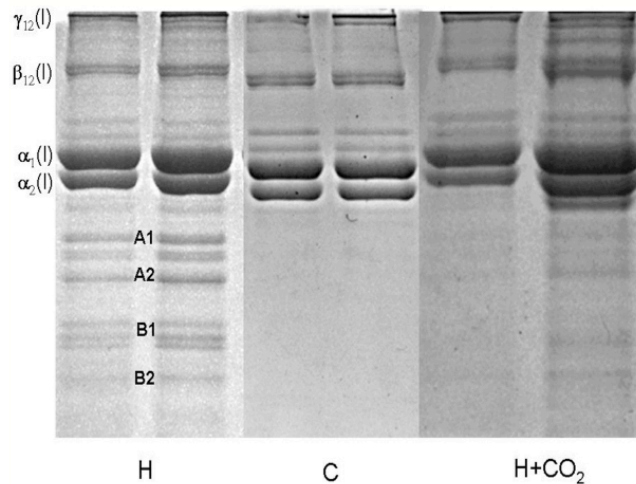
**Fig. 1.** Concentration of lipofuscin-like fluorescent pigments after 3 weeks exposure to ambient air, hypoxia and hypoxia with hypercapnia. H – group exposed to isobaric hypoxia ( $F_{iO_2}=0.1$ ), H + CO<sub>2</sub> – group exposed to isobaric hypoxia ( $F_{iO_2}=0.1$ ) and hypercapnia ( $F_{iCO_2}=0.04-0.05$ ), N – normoxic controls.

prealveolar pulmonary vessels. The finding that HPH is attenuated by an increase in carbon dioxide concentration is in agreement with previously published studies (Ooi *et al.* 2000, Herget *et al.* 2001, Herget *et al.* 2002). The rats exposed to combined chronic hypoxia and hypercapnia had significantly lower pulmonary arterial blood pressure, significantly lower increase in right heart ventricle weight and less pronounced structural remodeling of the walls of peripheral pulmonary arteries. In acute experiments, hypercapnia added during hypoxic pulmonary vasoconstriction caused further constriction or dilatation of lung vessels, depending on the initial vascular tonus and species of experimental animal (Emery *et al.* 1977). Ventilatory consequences of hypercapnia may alter the PaO<sub>2</sub> for given FiO<sub>2</sub> in short-term exposures (Pepelko 1970). We were not able to measure PaO<sub>2</sub> in our rats acclimatized to chronic exposure. However, the absence of differences in hematocrit values found in H and H + CO<sub>2</sub> groups suggests that the presence of an important difference in the level of hypoxemia is unlikely.

The present study indicates that the probable mechanism whereby hypercapnia inhibits HPH *via* the inhibitory effect of carbon dioxide on tissue hypoxia-induced radical injury to the walls of peripheral pulmonary arteries. In recent years, several studies have provided the solid evidence that radical tissue injury is a crucial mechanism in the development of HPH (for review see Hampl and Herget 2000). Release of both oxygen radicals (Hoshikawa *et al.* 1995, Nakanishi *et al.* 1995, Herget *et al.* 2000, Hoshikawa *et al.* 2001) and NO with its derivatives (Hampl and Herget 2000, Hampl *et al.* 2006) play a role. Production of NO and ROS peaks at the early phase of exposure to hypoxia (Hoshikawa *et al.*



**Fig. 2.** Four days of exposure to ambient air (N), hypoxia (H) and hypoxia with hypercapnia (H + CO<sub>2</sub>). Data are means ± SEM, numbers of rats are in parentheses. **A.** amount of expired NO of awake rats, **B.** concentration of NOx in plasma, **C.** concentration of plasma nitrotyrosine (marker of superoxide and NO interaction).



**Fig. 3.** Typical SDS-PAGE gel electrophoresis of collagen fraction isolated from peripheral pulmonary arteries of rats exposed to chronic hypoxia (H), normal control rat (C) and rats exposed to hypoxia and hypercapnia (H + CO<sub>2</sub>). γ - gamma fraction, chain polymers of individual α chains of collagen type I; β - beta fraction, chain dimers of individual α chains of collagen type I; α<sub>1</sub> - individual α1 chains of collagen type I; α<sub>2</sub> - α2 chains of collagen type I; A1 - ¾ fragments of α1 chains; A2 - ¾ fragments of α2 chains; B1 - ¼ fragments of α1 chains; B2 - ¼ fragments of α2 chains.

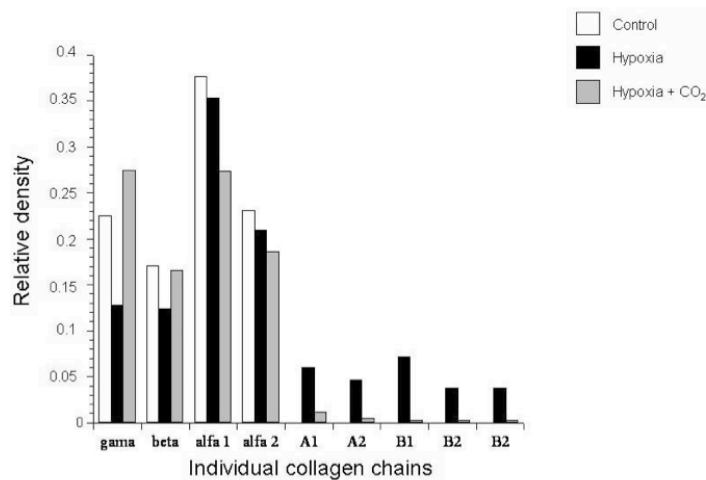
2001, Lachmanová *et al.* 2005, Hampl *et al.* 2006). Several groups reported a protective role of hypercapnia against free radical injury (Shibata *et al.* 1998, Laffey *et al.* 2000, Lavani *et al.* 2007, Skoumalová *et al.* 2008). The mechanism of this action may be linked to the stabilization of iron-transferin binding due to synergistic action of bicarbonate (Edeker *et al.* 1995) or to the interaction of CO<sub>2</sub> with peroxynitrite and the formation of nitrosoperoxycarbonate with a very short lifetime and therefore restricted diffusion area (Lymar and Hurst 1996, Uppu *et al.* 1996). We assume that peroxynitrite, a highly reactive product of superoxide-nitric oxide interaction (Huie and Padmaja 1993, Beckman and Koppenol 1996), triggers the collagen breakdown in hypoxia-induced injury of prealveolar pulmonary blood

vessels (Novotná and Herget 2002) and starts the process of remodeling. The finding that serum concentration of nitrotyrosine (marker of peroxynitrite formation (Beckman 1996) was significantly lower in the H + CO<sub>2</sub> group than in the hypoxic group without hypercapnia is, therefore, in agreement with our observation of less activated collagenolysis and less pronounced remodeling in vessels from rats exposed to hypoxia and hypercapnia.

The interpretation of our results is that hypercapnia inhibits hypoxia-induced tissue injury. Consequently, less NO and ROS is released and the vascular damage is less pronounced.

The alternative explanation is that HPH is decreased because of a vasorelaxant effect of CO<sub>2</sub>. Belik *et al.* (2009) reported enhancement of endothelium-





**Fig. 4.** Relative density of collagen  $\gamma$ ,  $\beta$  and  $\alpha$  fraction and  $\frac{3}{4}$  and  $\frac{1}{4}$  fragments A1, A2, B1, B2 isolated from peripheral pulmonary arteries of rats exposed to chronic hypoxia (H), normal control rat (C) and rats exposed to hypoxia and hypercapnia (H + CO<sub>2</sub>), separated by SDS-PAGE gel electrophoresis.

dependent vasodilatation by severe chronic hypercapnia (10 %). An increase in NO production was ascribed to downregulation of arginase expression and a subsequent increase in endothelial NO production (Belik *et al.* 2009). This alternative is not supported by our finding of less exhaled NO in the group exposed to hypoxia and hypercapnia than in the group kept in hypoxia alone. It should be noted, however, that our rats were exposed to much less severe hypercapnia (4 %).

In summary, we report that concomitant hypercapnia inhibits the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension. This is in agreement with the generally accepted permissive effect of hypercapnia (Laffey and Kavanagh 1999).

### Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

### Acknowledgements

Supported by grants GACR 305/05/08/108 and GAUK 78007 as well as by Cardiovascular Research Center 1M510. Preliminary report of the part of results was presented at the Experimental Biology Meeting 2009, New Orleans, USA and Meeting of the Czech Physiological Society, 2001 and 2002, Prague, Czech Republic. We would like to thank to our lab assistants: Ms Olga Hniličková and Pavlína Smolková for assisting experiments and Ms Elizabeth "Liz" Coling help with the manuscript preparation.

### References

- ASTIN TW: Airways obstruction and arterial blood gas tensions in chronic obstructive lung disease. *Respiration* **29**: 74-82, 1972.
- BECKMAN JS: Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* **9**: 836-844, 1996.
- BECKMAN JS, KOPPENOL WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271**: C1424-C1437, 1996.
- BELIK J, STEVENS D, PAN J, SHEHNAZ D, IBRAHIM C, KANTORES C, IVANOVSKA J, GRASEMANN H, JANKOV RP: Chronic hypercapnia downregulates arginase expression and activity and increases pulmonary arterial smooth muscle relaxation in the newborn rat. *Am J Physiol* **297**: L777-L784, 2009.
- CANEPA A, CHAVEZ R, HURTADO A, ROTTA A, VELASQUEZ T: Pulmonary circulation at sea level and at high altitudes. *J Appl Physiol* **9**: 328-336, 1956.
- EDEKER BL, RASMUSSEN GT, BRITIGAN BE: Bicarbonate and phosphate ions protect transferrin from myeloperoxidase-mediated damage. *J Leukoc Biol* **58**: 59-64, 1995.
- EMERY CJ, SLOAN PJ, MOHAMMED FH, BARER GR: The action of hypercapnia during hypoxia on pulmonary vessels. *Bull Eur Physiopathol Respir* **13**: 763-776, 1977.
- HAMPL V, HERGET J: Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* **142**: 619-624, 1990.

- HAMPL V, HERGET J: Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* **80**: 1337-1384, 2000.
- HAMPL V, BÍBOVÁ J, POVÝŠILOVÁ V, HERGET J: Dehydroepiandrosterone sulphate reduces chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Eur Respir J* **21**: 862-865, 2003.
- HAMPL V, BÍBOVÁ J, BAŇASOVÁ A, UHLÍK J, MIKOVÁ D, HNILIČKOVÁ O, LACHMANOVÁ V, HERGET J: Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol* **290**: L11-L20, 2006.
- HERGET J, PALEČEK F: Pulmonary arterial blood pressure in closed chest rats. Changes after catecholamines, histamine and serotonin. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **198**: 107-117, 1972.
- HERGET J, SUGGETT AJ, LEACH E, BARER GR: Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax* **33**: 468-473, 1978.
- HERGET J, WILHELM J, NOVOTNÁ J, ECKHARDT A, VYTÁŠEK R, MRÁZKOVÁ L, OŠTÁDAL M: A possible role of oxidant tissue injury in the development of pulmonary hypertension. *Physiol Res* **49**: 493-501, 2000.
- HERGET J, VYTÁŠEK R, BAŇASOVÁ A, BÍBOVÁ J, HAMPL V, FIŠÁRKOVÁ B: Hypercapnia inhibits hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Physiol Res* **50**: P7, 2001.
- HERGET J, NOVOTNÁ J, BLÁHOVÁ L: Effect of hypercapnia on vascular remodelling induced by chronic hypoxia. *Physiol Res* **51**: 12P, 2002.
- HOSHIKAWA Y, ONO S, TANITA S, SAKUMA T, NODA M, TABATA T, UEDA S, ASHINO Y, FUJIMURA S: Contribution of oxidative stress to pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* **33**: 1169-1173, 1995.
- HOSHIKAWA Y, ONO S, SUZUKI S, TANITA T, CHIDA M, SONG C, NODA M, TABATA T, VOELKEL NF, FUJIMURA S: Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J Appl Physiol* **90**: 1299-1306, 2001.
- HOWELL K, OOI H, PRESTON R, McLOUGHLIN P: Structural basis of hypoxic pulmonary hypertension: the modifying effect of chronic hypercapnia. *Exp Physiol* **89**: 66-72, 2004.
- HUIE RE, PADMAJA S: The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* **18**: 195-199, 1993.
- HULTGREN HN, GROVER RJ: Circulatory adaptation to high altitude. *Annu Rev Med* **16**: 119-152, 1968.
- KANTORES C, McNAMARA PJ, TEIXEIRA L, ENGELBERTS D, MURTHY P, KAVANAGH BP, JANKOV RP: Therapeutic hypercapnia prevents chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in the newborn rat. *Am J Physiol* **291**: L912-L922, 2006.
- LAFHEY JG, KAVANAGH BP: Carbon dioxide and the critically ill – too little of a good thing? *Lancet* **354**: 1283-1286, 1999.
- LAFHEY JG, TANAKA M, ENGELBERTS D, LUO X, YUAN S, TANSWELL AK, POST M, LINDSAY T, KAVANAGH BP: Therapeutic hypercapnia reduces pulmonary and systemic injury following in vivo lung reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* **162**: 2287-2294, 2000.
- LACHMANOVÁ V, HNILIČKOVÁ O, POVÝŠILOVÁ V, HAMPL V, HERGET J: N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sci* **77**: 175-182, 2005.
- LAPP M, SEATON A, KAPLAN L, MR H, MORGAN W: Pulmonary hemodynamics in symptomatic coal miners. *Am Rev Respir Dis* **104**: 418-429, 1971.
- LAVANI R, CHANG WT, ANDERSON T, SHAO ZH, WOJCIK KR, LI CQ, PIETROWSKI R, BEISER DG, IDRIS AH, HAMANN KJ, BECKER LB, VANDEN HOEK TL: Altering CO<sub>2</sub> during reperfusion of ischemic cardiomyocytes modifies mitochondrial oxidant injury. *Crit Care Med* **35**: 1709-1716, 2007.
- LYMAR SV, HURST JK: Carbon dioxide: physiological catalyst for peroxynitrite-mediated cellular damage or cellular protectant? *Chem Res Toxicol* **9**: 845-850, 1996.
- NAKANISHI I, TAJIMA F, NAKAMURA A, YAGURA SY, OOKAWARA T, YAMASHITA H, SUZUKI K, TANIGUCHI N, OHNO H: Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J Physiol Lond* **489**: 869-876, 1995.
- NOVOTNÁ J, HERGET J: Exposure to chronic hypoxia induces qualitative changes of collagen in the walls of peripheral pulmonary arteries. *Life Sci* **62**: 1-12, 1998.

- NOVOTNÁ J, HERGET J: Possible role of matrix metalloproteinases in reconstruction of peripheral pulmonary arteries induced by hypoxia. *Physiol Res* **51**: 323-334, 2002.
- OOI H, CADOGAN E, SWEENEY M, HOWELL K, O'REGAN RG, MCLOUGHLIN P: Chronic hypercapnia inhibits hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol* **278**: H331-H338, 2000.
- PEPELKO WE: Effects of hypoxia and hypercapnia, singly and combined, on growing rats. *J Appl Physiol* **28**: 646-651, 1970.
- SHIBATA K, CREGG N, ENGELBERTS D, TAKEUCHI A, FEDORKO L, KAVANAGH BP: Hypercapnic acidosis may attenuate acute lung injury by inhibition of endogenous xanthine oxidase. *Am J Respir Crit Care Med* **158**: 1578-1584, 1998.
- SKOUMALOVÁ A, HERGET J, WILHELM J: Hypercapnia protects erythrocytes against free radical damage induced by hypoxia in exposed rats. *Cell Biochem Funct* **26**: 801-807, 2008.
- UPPU RM, SQUADRITO GL, PRYOR WA: Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys* **327**: 335-343, 1996.
- WILHELM J, HERGET J: Hypoxia induces free radical damage to rat erythrocytes and spleen. Analysis of the fluorescent end-products of lipid peroxidation. *Int J Biochem Mol Biol* **31**: 671-681, 1999.
- WILKINSON M, LANGHORNE CA, HEATH D, BARER GR, HOWARD P: A pathophysiological study of 10 cases of hypoxic cor pulmonale. *Q J Med* **66**: 65-85, 1988.

## **9. Rukopis publikace č. 2**



**Subject:** Prijeti MS 932463 k publ. + publ. popl.

**Date:** úterý, 26. března 2013 22:02:28 Středoevropský standardní čas

**From:** physres

**To:** Milan Chovanec

Ref. c. rukopisu: **932463**

Nazev: **L-arginine in combination with sildenafil potentiates the attenuation of hypoxic pulmonary hypertension in rats**

Autor(i): **Al-Hiti H. et al.**

Vazeny pane doktore,

vyše uvedená práce (Original Article) Vaseho autorského kolektivu byla po recenzním řízení schválena k přijetí k tisku v časopise Physiological Research.

Vzhledem k současným finančním obtížím české vědy jsme nuceni zadat autory o krytí části publikacních nákladů (viz příloha Publishing Costs).

Nyní očekáváme Vaši platbu za publikování článku (page charge), která v případě Vaseho článku činí **7000 CZK** (7 stran zformátovaného textu x 1000 CZK).

Prislusnou částku (**7000 CZK**) nam zaslete:

- 1) (prednostne) bankovním převodem (Cislo účtu: 1342 9041/ 0710, IBAN: CZ33 0710 0000 0000 1342 9041, SWIFT Code: CNBACZPP, Adresa banky: Ceska narodni banka, Na Příkopě 28, 115 03 Praha 1, Ceska republika, Nazev účtu: Fyziologicky ustav AV CR, v.v.i., Zprava pro příjemce ("Pole 70"): /VS/ 932463). Vsechny poplatky spojené s převodem musí uhradit platce.
- 2) nebo (pokud nelze bankovním převodem) seken vystaveným na příjemce: Fyziologicky ustav AV CR, v.v.i. a zaslaným v obálce na adresu: Redakce časopisu Physiological Research, Fyziologicky ustav AV CR, v.v.i., Videnka 1083, 142 20 Praha 4, Ceska republika).

Sdělte nam, prosim, informace o způsobu platby a platební údaje (nejlepe zaslaním naskenované kopie bankovního příkazu e-mailem do naší redakce). Usnadníte a urychlíte tím identifikaci platby naší uctárnou.

**Důležité:**

- a) Na práni ekonoma 2. LF UK, které se týká článku zaslaných nam autory z této fakulty, bude **danový doklad** po obdržení Vaší platby publikacího poplatku vystaven naší uctárnou na platce:

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. lékařská fakulta

V UVALU 84

150 06 PRAHA 5

ICO: 00216208

DIC: CZ00216208

a zaslan e-mailem na adresu:

<rita.zdrubecka@lfmotol.cuni.cz>

**Pokud byste si přáli, aby platcem publikacího poplatku byla jiná právnická či fyzická osoba než vyše uvedená, dejte nam to, prosim (nejlepe obratem) vedet, aby nedošlo k nesprávnému zaúčtování, které již nelze v počítačovém systému naší uctárny menit. (Potřebujeme znát přesný název a adresu platce /muze být buď právnická, nebo fyzická osoba/ a jeho ICO a DIC (VAT Nr.) /jsou-li přidělena/.)**



L-Arginine in combination with sildenafil potentiates the attenuation of hypoxic pulmonary hypertension in rats

Hikmet Al-Hiti<sup>1</sup>, Milan Chovanec<sup>2,3</sup>, Vojtěch Melenovský<sup>1</sup>, Olga Vajnerová<sup>3</sup>, Alena Baňasová<sup>3</sup>, Josef Kautzner<sup>1</sup> and Jan Herget<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine and <sup>2</sup>Department of Cardiology, Na Homolce Hospital and <sup>3</sup>Department of Physiology, <sup>4</sup>Department of Patophysiology, Second Medical School, Charles University, Prague, Czech Republic

Corresponding author:

Milan Chovanec, Department of Physiology, Second Medical School, Charles University, Plzenska 130/221, 15000 Prague, Czech Republic; Email: milan.chovanec@lfmotol.cuni.cz

Short title:

L-Arginine and sildenafil attenuate of pulmonary hypertension

## Summary

Chronic hypoxia induces an increased production of nitric oxide (NO) in pulmonary prealveolar arterioles. Bioavailability of the NO in the pulmonary vessels correlates with concentration of L-arginine as well as activity of phosphodiesterase-5 enzyme (PDE-5). We tested a hypothesis whether a combination of L-arginine and PDE-5 inhibitor sildenafil has an additive effect in reduction of the hypoxic pulmonary hypertension (HPH) in rats. Animals were exposed to chronic normobaric hypoxia for 3 weeks. In the AH group, rats were administered L-arginine during chronic hypoxic exposure. In the SH group, rats were administered sildenafil during chronic hypoxic exposure. In the SAH group, rats were treated by the combination of L-arginine as well as sildenafil during exposure to chronic hypoxia. Mean PAP, structural remodelling of peripheral pulmonary arterioles (%DL) and RV/LV+S ratio was significantly decreased in the SAH group compared to hypoxic controls even decreased compared to the AH and the SH groups in first two measured parameters. Plasmatic concentration of cGMP and NOx were significantly lower in the SAH group compared to hypoxic controls. We demonstrate that NO synthase substrate L-arginine and phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil administered in combination are more potent in attenuation of the HPH compared to a treatment by substances given alone.

## Key words

pulmonary hypertension, chronic hypoxia, L-arginine, sildenafil.

## Introduction

Morbidity and mortality of pulmonary arterial hypertension (PAH) still remains high. The production of nitric oxide (NO) in pulmonary arterioles increases during exposure to chronic hypoxia (Hampl et al. 1993; Xue et al. 1994). It suggests NO has an important role in the adaptation of the pulmonary circulation to elevated blood pressure. The production of NO in the pulmonary vessels is related to the concentration of L-arginine as a substrate for NO synthesis (Palmer et al. 1988; Stuehr et al. 1991). It is reported that administration of L-arginine increases NO production (Fike et al. 2000) as well as decreases pulmonary hypertension caused by chronic hypoxia (hypoxic pulmonary hypertension, HPH) (Mitani et al. 1997). Nitric oxide in smooth muscle cells binds to soluble guanylate cyclase and activates the production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP). Cyclic GMP activates processes which result in the activation of voltage-gated potassium channels and inhibition of the depolarization of the smooth muscle cells and thus leads to vasodilation (Murad 1986; Archer et al. 1994). The soluble cGMP is degraded by the phosphodiesterase (PDE) enzyme (specific isoform number 5) in pulmonary arterioles. Inhibition of PDE activity by sildenafil has a significant vasodilatory effect in the developed HPH in rats (Cohen et al. 1996) and also in patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) (Michelakis et al. 2002). The effective vasodilatory therapy has been considered an important factor in improving quality of life in patients with PAH (D'Alonzo et al. 1991). The PDE inhibitors are used most often in combination with other drugs in treatment of PAH: in combination with prostacycline analogues (Itoh et al. 2004; Clozel et al. 2006), in combination with endothelin receptor A inhibitors (Mouchaers et al. 2009), and in combination with HMG-CoA inhibitors (Satoh and Satoh 2008; Zhao et al. 2009). Every used combination has a moderate potentiation effect in decreasing the pulmonary artery pressure compared to the PDE inhibitor alone.

**In the present study in rats, we tested the hypothesis whether the combination of L-arginine and the PDE-5 inhibitor sildenafil is more effective in reduction of the development of HPH than the drugs administered alone.**

## Methods

Experiments on five groups of adult male Wistar rats (BW 220-250g at the beginning of the experiment) were performed in accordance with the European Community and NIH guidelines for the

use of experimental animals. All experiments were approved by our institution's Animal Studies Committee.

#### Experimental groups and drug administration:

Experimental animals were exposed to chronic hypoxia in an isobaric hypoxic chamber ( $F_{iO_2}=0.1$ ) for 3 weeks. Experimental group AH (n=10) were rats administered with L-arginine (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Czech Republic), 500mg.kg<sup>-1</sup> per day by gavage during hypoxia exposition. We used a similar effective dose of L-arginine as other researchers (Mitani et al. 1997). Group SH (n=10) were rats administered with the PDE-5 inhibitor sildenafil (Revatio 20mg tbl, Pfizer<sup>®</sup>), 25mg.kg<sup>-1</sup> per day by gavage during hypoxia. In the literature, the dosage of sildenafil varies from 1mg.kg<sup>-1</sup> to 100mg.kg<sup>-1</sup> per day or more (Preston et al. 2004; Clozel et al. 2006; Satoh and Satoh 2008; Zhao et al. 2009). We decided to use a lower dose of sildenafil (25mg.kg<sup>-1</sup> per day) to unmask the potentially amplifying effect of L-arginine. Group SAH (n=10) were rats given a combination of L-arginine and sildenafil during hypoxia. Group H (n=10) were rats exposed to chronic hypoxia with no drugs. Group N (n=10) were normoxic controls. All animals lived in 12 hours diurnal cycles and had free access to water and food. The gavage technique was used to avoid the influence of food and water intake decrease during hypoxic exposure (Singh and Selvamurthy 1993).

#### Experimental protocol and measurements:

After 3 weeks of hypoxia, rats were anesthetized with thiopental (30mg.kg<sup>-1</sup> b.w. i.p.). In closed-chest spontaneously breathing animals, we measured the mean pulmonary artery pressure (PAP) (Herget and Palecek 1972). After measurement of PAP, the animals were ventilated with air through a tracheal cannula (50 breaths.min<sup>-1</sup>; peak inspiratory pressure 10 cmH<sub>2</sub>O; positive end-expiratory pressure 2 cmH<sub>2</sub>O). The chest was then opened by sternotomy and an ultrasound flow probe with J transducer (Transonic Systems Inc, Ithaca, NY, USA) was placed on the ascending aorta to measure cardiac output (Hampl et al. 1993). Subsequently, arterial blood samples were collected for measuring cGMP and hematocrit. The plasma concentration of NO and its oxidation products (nitrites and nitrates, NOx) were measured with a chemiluminescence NO analyzer using the methods described earlier (Sun et al. 2010). Finally, the heart and lungs were removed from the thoracic cavity. The heart was dissected and weighed in parts (Fulton et al. 1952). Lungs were filled with formol solution through the trachea for assessing the presence of hypoxia-induced structural remodelling of peripheral pulmonary arteries. The same person blinded to the study group from which the specimen originated calculated

all scores. The results are presented as the proportion of peripheral vessels with separated elastic laminae (double-laminated, %DL) (Herget et al. 1978).

Cyclic GMP was determined from blood samples which were frozen and stored at -80°C until measurement was performed by the radioimmunoassay kit (Immunotech Inc).

Statistical analysis:

Results were analyzed by 1-way ANOVA with Fischer *post-hoc* test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. The results are presented as means  $\pm$  SEM.

## Results

Body weight, cardiac output and hematocrit did not differ in any of the groups exposed to chronic hypoxia (tab. 1). Plasma concentration of cGMP was increased in all groups exposed to hypoxia compared to normoxic controls, however, rats administered by L-arginine and a combination of L-arginine with sildenafil had a significantly higher cGMP concentration than hypoxic controls (tab.1). The group with combined treatment had significantly higher concentrations of nitrites and nitrates (NO<sub>x</sub>) compared to all other groups (tab.1).

Animals exposed to hypoxia with administration of drugs had significantly lower mean PAP compared to non-treated hypoxic rats. Mean PAP in the SAH group was significantly lower compared to the groups administered with L-arginine or sildenafil alone (fig.1). We found the right heart ventricle weight was significantly reduced in the SAH group compared to the H group, but not in the AH and SH groups (fig. 2). Presence of the double laminated pulmonary arterioles was significantly lower in the groups exposed to hypoxia with administration of drugs compared to hypoxic controls, but the SAH group had significantly lower %DL compared to the AH and SH groups (fig. 3).

## Discussion

We demonstrate that the NO synthase substrate L-arginine and the phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil added in combination are more potent in the attenuation of HPH compared to treatment by substances given alone. Combined administration was more potent in decreasing mean PAP; it reduced the hypoxia-induced remodelling of the prealveolar pulmonary arterioles and

significantly reduced right heart hypertrophy. Adding L-arginine together with sildenafil resulted in increased plasma concentrations of NOx and cGMP compared to hypoxic non-treated rats.

In rats treated with L-arginine alone, we found slightly, but significantly attenuated HPH which coincides with increased plasma concentration of cGMP. These data are consistent with the other researchers (Mitani et al. 1997; Fagan et al. 1999). In the present experiment we did not find, however, any effect of L-arginine on the right heart hypertrophy induced by chronic hypoxia. Mitani et al. (Mitani et al. 1997) reported that right heart ventricle hypertrophy reduction during chronic hypoxia with L-arginine administered intraperitoneally was dose dependent: 500 mg.kg<sup>-1</sup> of L-arginine was effective but 200mg.kg<sup>-1</sup> had no effect. In our experiment we used 500 mg.kg<sup>-1</sup> of L-arginine, but it was given by a gastric gavage. The amount of L-arginine absorbed in the animal gastrointestinal tract could be lower than after intraperitoneal application. The release of insulin and growth hormones by administration of parenteral L-arginine may be considered also (Giugliano et al. 1997). **The effect of the L-arginine administered could be explained by its bioavailability and/or by competition with the endogenous asymmetric methylarginines (ADMA). The increased concentration of ADMA was found in patients with pulmonary hypertension (Gorenflo et al. 2001). ADMA acts as an endogenous inhibitor of the NO synthase (Vallance et al. 1992). In conditions of oxidant stress L-arginine supplementation may exacerbate NOS uncoupling, production of superoxide prevails NO and the radical tissue injury worsens (Druhan et al. 2008)**

Results of the studies where authors administered the PDE-5 inhibitor sildenafil alone in HPH are partly controversial. We found lower mean PAP and reduced remodelling of the peripheral pulmonary arterioles compared to hypoxic controls. These results are in accordance with the other researchers (Hanasato et al. 1999; Sebkhi et al. 2003). On the other hand we did not find a reduction of the right heart hypertrophy and we did not find a difference in plasma concentration of the cGMP compared to hypoxic rats. Similar results were found in mice in experiments by Zhao *et al.* (Zhao et al. 2001). They found significantly increased cGMP concentration in lung homogenate but not in plasma in chronic hypoxia exposed mice administered with 25mg.kg<sup>-1</sup> per day of sildenafil. In the case of right heart hypertrophy, we found even more controversies in the literature. No comparable experiment was reported which would directly compare the effect of sildenafil administration on hypoxia induced right heart hypertrophy in rat species. Zhao *et al.* (Zhao et al. 2001) found significantly decreased right

heart hypertrophy in mice after 25mg per kg of sildenafil during chronic normobaric hypoxia. Hanasato *et al.* (Hanasato et al. 1999), used a different PDE-5 inhibitor: E-4010, hypobaric hypoxia and more importantly, they used pretreatment with a PDE-5 inhibitor for 1 day before hypoxia exposition. The other study suggested that sildenafil efficacy on the right heart hypertrophy is not dose-dependent in doses of 3mg.kg<sup>-1</sup> per day and more (Hanasato et al. 1999).

The increase in NO production during the exposure to chronic hypoxia is consistent with several of our former studies (Hampl et al. 2006; Hodyc et al. 2012) and studies of other research groups (see review (Hampl and Herget 2000)). NO plays an important role in chronic hypoxia induced structural and functional changes in prealveolar vessels. In the early phase of hypoxic exposure, increased NO production participates with oxygen radicals in the pathogenesis of HPH (Herget et al. 2000; Hampl et al. 2006). In the later phase of hypoxic exposure, increased NO production restricts already developed hypertension (see review (Hampl and Herget 2000)). Nitric oxide is not only a vasodilator and smooth muscle cells remodelling inhibitor, it also inhibits platelet aggregation (Adams et al. 1995), as well as decreases endothelial activation of adhesion molecules and proinflammatory cytokines (De Caterina et al. 1995). The other, additional, mechanisms which may be involved in our study should also be considered. The antiaggregatory effect of L-arginine on blood platelets and PDE-5 in pulmonary circulation is thought to limit the vasodilator and antiproliferative effects of the NO (Sebkhi et al. 2003).

In the present study, we focused on the administration of minimal but still effective doses of L-arginine and the PDE-5 inhibitor sildenafil to reveal a potentially synergistic effect of the combination of drugs. Our data clearly presents a pure synergistic effect of the combination of the L-arginine and the PDE-5 inhibitor sildenafil in rat model on attenuation of the development of HPH, characterized by significantly decreased mean PAP, significantly decreased remodelling of the peripheral pulmonary arterioles and significantly reduced right heart hypertrophy. **Present experimental study suggests novel direction how to enhance the therapeutic effects of PDE-5 inhibitors in hypoxic pulmonary hypertension.**

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to our laboratory assistants: Ms Olga Hniličková and Ms Pavlína Smolková for assisting the experiments. In addition, we would like to thank Ms Monika Taylor and Mr Jack Coling for helping us with the manuscript preparation.

## References

- ADAMS MR, FORSYTH CJ, JESSUP W, ROBINSON J, CELERMAJER DS: Oral L-arginine inhibits platelet aggregation but does not enhance endothelium-dependent dilation in healthy young men. *J Am Coll Cardiol* **26**: 1054-1061, 1995.
- ARCHER SL, HUANG JM, HAMPL V, NELSON DP, SHULTZ PJ, WEIR EK: Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7583-7587, 1994.
- CLOZEL M, HESS P, REY M, IGLARZ M, BINKERT C, QIU C: Bosentan, sildenafil, and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**: 967-973, 2006.
- COHEN AH, HANSON K, MORRIS K, FOUTY B, MCMURTY IF, CLARKE W, RODMAN DM: Inhibition of cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase selectively vasodilates the pulmonary circulation in chronically hypoxic rats. *J Clin Invest* **97**: 172-179, 1996.
- D'ALONZO GE, BARST RJ, AYRES SM, BERGOFSKY EH, BRUNDAGE BH, DETRE KM, FISHMAN AP, GOLDRING RM, GROVES BM, KERNIS JT, ET AL.: Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* **115**: 343-349, 1991.
- DE CATERINA R, LIBBY P, PENG HB, THANNICKAL VJ, RAJAVASHISTH TB, GIMBRONE MA, JR., SHIN WS, LIAO JK: Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* **96**: 60-68, 1995.
- DRUHAN LJ, FORBES SP, POPE AJ, CHEN CA, ZWEIER JL, CARDOUNEL AJ: Regulation of eNOS-derived superoxide by endogenous methylarginines. *Biochemistry* **47**: 7256-7263, 2008.
- FAGAN JM, REX SE, HAYES-LICITRA SA, WAXMAN L: L-arginine reduces right heart hypertrophy in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* **254**: 100-103, 1999.
- FIKE CD, KAPLOWITZ MR, REHORST-PAEA LA, NELIN LD: L-Arginine increases nitric oxide production in isolated lungs of chronically hypoxic newborn pigs. *J Appl Physiol* **88**: 1797-1803, 2000.
- FULTON RM, HUTCHINSON EC, JONES AM: Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J* **14**: 413-420, 1952.
- GIUGLIANO D, MARFELLA R, VERRAZZO G, ACAMPORA R, COPPOLA L, COZZOLINO D, D'ONOFRIO F: The vascular effects of L-Arginine in humans. The role of endogenous insulin. *J Clin Invest* **99**: 433-438, 1997.

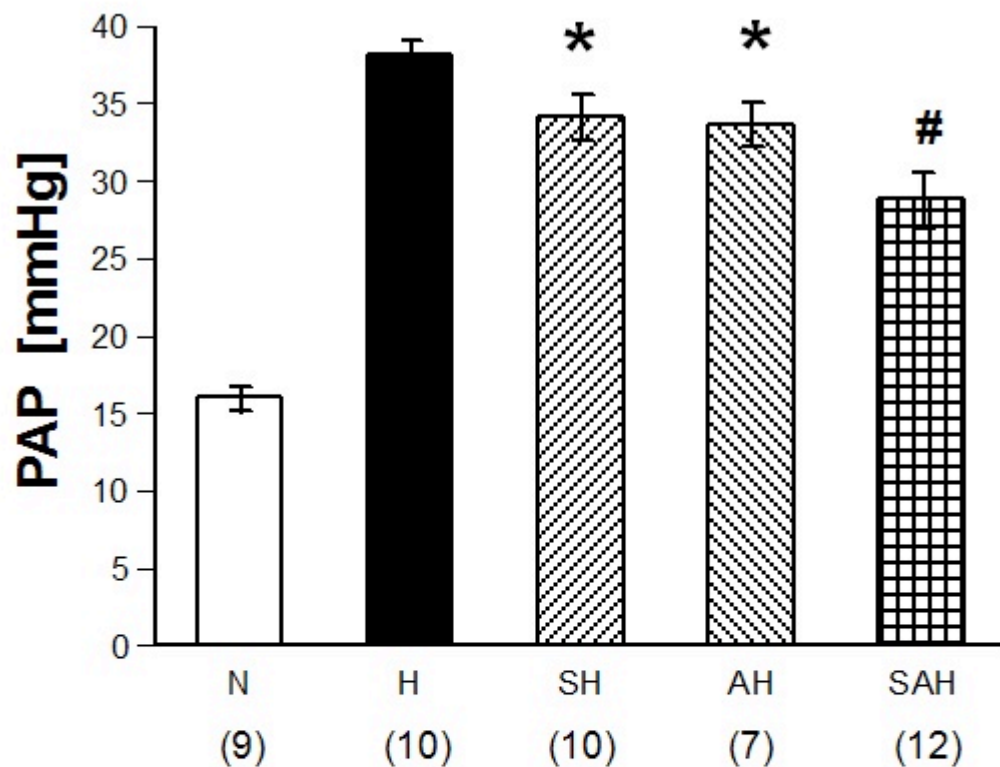


- GORENFLO M, ZHENG C, POGE A, BETTENDORF M, WERLE E, FIEHN W, ULMER HE: Metabolites of the L-arginine-NO pathway in patients with left-to-right shunt. *Clin Lab* **47**: 441-447, 2001.
- HAMPL V, ARCHER SL, NELSON DP, WEIR EK: Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J Appl Physiol* **75**: 1748-1757, 1993.
- HAMPL V, BIBOVA J, BANASOVA A, UHLIK J, MIKOVA D, HNILICKOVA O, LACHMANOVA V, HERGET J: Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**: L11-20, 2006.
- HAMPL V, HERGET J: Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* **80**: 1337-1372, 2000.
- HANASATO N, OKA M, MURAMATSU M, NISHINO M, ADACHI H, FUKUCHI Y: E-4010, a selective phosphodiesterase 5 inhibitor, attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol* **277**: L225-232, 1999.
- HERGET J, PALECEK F: Pulmonary arterial blood pressure in closed chest rats. Changes after catecholamines, histamine and serotonin. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **198**: 107-117, 1972.
- HERGET J, SUGGETT AJ, LEACH E, BARER GR: Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax* **33**: 468-473, 1978.
- HERGET J, WILHELM J, NOVOTNÁ J, ECKHARDT A, VYTÁŠEK R, MRÁZKOVÁ L, OŠŤÁDAL M: A possible role of oxidant tissue injury in the development of pulmonary hypertension. *Physiol Res* **49**: 493 - 501, 2000.
- HODYC D, JOHANSON E, SKOUMALOVA A, TKACZYK J, MAXOVÁ H, VÍZEK M, HERGET J: Reacitvr oxygen species prodiction in early and later stage of chronic ventilatory hypoxia. *Physiol Res* **61**: 145 - 151, 2012.
- ITOH T, NAGAYA N, FUJII T, IWASE T, NAKANISHI N, HAMADA K, KANGAWA K, KIMURA H: A combination of oral sildenafil and beraprost ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **169**: 34-38, 2004.
- MICHELAKIS E, TYMCHAK W, LIEN D, WEBSTER L, HASHIMOTO K, ARCHER S: Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* **105**: 2398-2403, 2002.
- MITANI Y, MARUYAMA K, SAKURAI M: Prolonged administration of L-arginine ameliorates chronic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Circulation* **96**: 689-697, 1997.
- MOUCHAERS KT, SCHALIJ I, VERSTEILEN AM, HADI AM, VAN NIEUW AMERONGEN GP, VAN HINSBERGH VW, POSTMUS PE, VAN DER LAARSE WJ, VONK-NOORDEGRAAF A: Endothelin receptor blockade combined with phosphodiesterase-5 inhibition increases right ventricular mitochondrial capacity in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**: H200-207, 2009.
- MURAD F: Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* **78**: 1-5, 1986.
- PALMER RM, ASHTON DS, MONCADA S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**: 664-666, 1988.
- PRESTON IR, HILL NS, GAMBARDELLA LS, WARBURTON RR, KLINGER JR: Synergistic effects of ANP and sildenafil on cGMP levels and amelioration of acute hypoxic pulmonary hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**: 920-925, 2004.

- SATOH M, SATOH A: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-COA reductase inhibitors and phosphodiesterase type V inhibitors attenuate right ventricular pressure and remodeling in a rat model of pulmonary hypertension. *J Pharm Pharm Sci* **11**: 118s-130s, 2008.
- SEBKHI A, STRANGE JW, PHILLIPS SC, WHARTON J, WILKINS MR: Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **107**: 3230-3235, 2003.
- SINGH SB, SELVAMURTHY W: Effect of intermittent chronic exposure to hypoxia on feeding behaviour of rats. *Int J Biometeorol* **37**: 200-202, 1993.
- STUEHR DJ, KWON NS, NATHAN CF, GRIFFITH OW, FELDMAN PL, WISEMAN J: N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* **266**: 6259-6263, 1991.
- SUN Y, ZHU Z, LANGNAS AN, GRANT WJ, BOTHA JF, ZHAO Y, SUDAN DL, MERCER DF: Plasma nitrite and nitrate levels as a noninvasive marker of pathology after human small bowel transplantation. *Transplantation* **89**: 307-311, 2010.
- VALLANCE P, LEONE A, CALVER A, COLLIER J, MONCADA S: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* **339**: 572-575, 1992.
- XUE C, RENGASAMY A, LE CRAS TD, KOBERNA PA, DAILEY GC, JOHNS RA: Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia. *Am J Physiol* **267**: L667-678, 1994.
- ZHAO L, MASON NA, MORRELL NW, KOJONAZAROV B, SADYKOV A, MARIPOV A, MIRRAKHIMOV MM, ALDASHEV A, WILKINS MR: Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **104**: 424-428, 2001.
- ZHAO L, SEBKHI A, ALI O, WOJCIK-STOTHARD B, MAMANOVA L, YANG Q, WHARTON J, WILKINS MR: Simvastatin and sildenafil combine to attenuate pulmonary hypertension. *Eur Respir J* **34**: 948-957, 2009.

	<b>BW</b> <b>[g]</b>	<b>CO</b> <b>[mL.min<sup>-1</sup>]</b>	<b>HTC</b> <b>[%]</b>	<b>cGMP in</b> <b>plasma [pM.L<sup>-1</sup>]</b>	<b>NOx in</b> <b>plasma [μM.L<sup>-1</sup>]</b>
<b>N</b>	405.6±33.3	34.3±7.2	43.4±3.7	0.1±0.04	21.4±2.8
<b>H</b>	274.4±22.4 *	20.0±3.7 *	68.4±4.6 *	73.5±27.8 *	27.3±4.7
<b>AH</b>	263.4±24.3 *	21.7±1.5 *	64.8±7.5 *	101.6±31.6 **	27.8±2.2
<b>SH</b>	253.2±11.6 **	25.8±5.9 #	72.5±3.8 *	95.6±26.1 *	22.5±1.5
<b>SAH</b>	258.0±18.0 *	22.6±6.0 *	70.0±5.8 *	113.3±29.5 **	38.0±4.4 ‡

Tab.1: BW – body weight in time of measurement; CO – cardiac output; HTC – hematocrit; cGMP – cyclic guanosine monophosphate. \* -  $P < 0.0001$  vs. group N; # -  $P < 0.01$  vs. group N; + -  $P < 0.05$  vs. group H. ‡ -  $P < 0.05$  vs. all other groups.

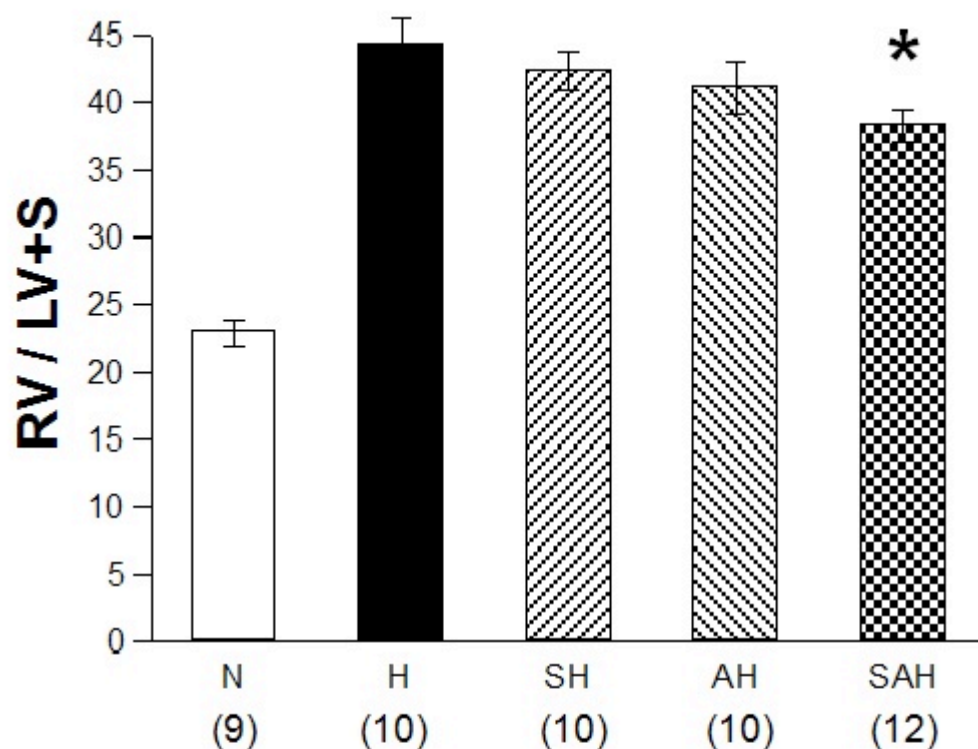


**Fig. 1: Pulmonary arterial mean pressure**

N – normoxic controls, ambient air H – hypoxic controls, 3 wks of hypoxia, SH – hypoxia exposure for 3wks and sildenafil administration; AH – hypoxia exposure for 3 wks and L-arginine administration; SAH – hypoxia for 3 wks and sildenafil plus L-arginine administration.

\* -  $p < 0.05$  vs. group H; # -  $p < 0.0001$  vs. group H and  $p < 0.05$  vs. groups SH and AH.

Data are means  $\pm$  SEM, numbers of rats are in parentheses.

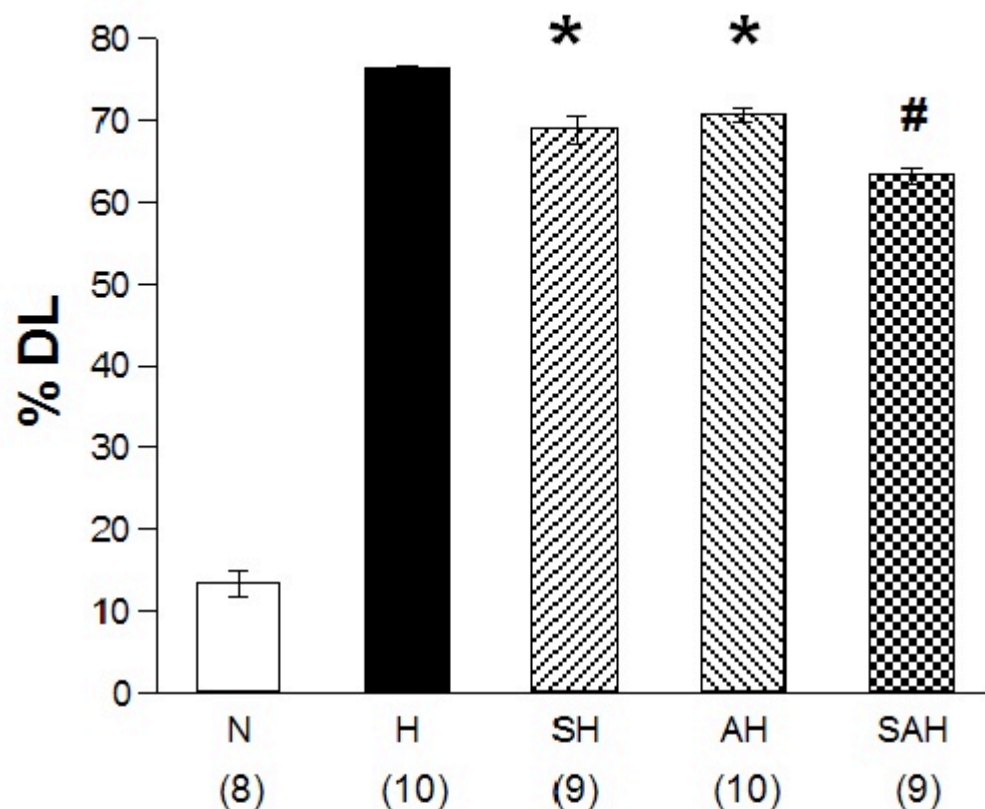


**Fig. 2: Right ventricular heart weight to the sum of weights of left heart ventricle and septum ratio.**

N – normoxic controls, ambient air H – hypoxic controls, 3 wks of hypoxia, SH – hypoxia exposure for 3wks and sildenafil administration; AH – hypoxia exposure for 3 wks and L-arginine administration; SAH – hypoxia for 3 wks and sildenafil plus L-arginine administration.

\*-  $p < 0.05$  vs. group H.

Data are means  $\pm$  SEM, numbers of rats are in parentheses.



**Fig. 3: Ratio of hypertrophied (double laminated) peripheral pulmonary arteries and total number of peripheral pulmonary arteries on section of the right lung.**

N – normoxic controls, ambient air H – hypoxic controls, 3 wks of hypoxia, SH – hypoxia exposure for 3wks and sildenafil administration; AH – hypoxia exposure for 3 wks and L-arginine administration; SAH – hypoxia for 3 wks and sildenafil plus L-arginine administration. \*-  $p < 0.001$  vs. group H; # -  $p < 0.001$  vs. group H, group SH and group AH.

Data are means  $\pm$  SEM, numbers of rats are in parentheses.

## **10. Publikace č. 3**



# Isolated perfused murine lung

## A well characterized preparation for studying lung vascular function

Jan Herget\*, Milan Chovanec

Department of Physiology, Second Medical School, Charles University Prague and Centre for Cardiovascular Research, Prague, Czech Republic

Preparations consisting of an isolated perfused lung from small laboratory animals is useful tool to study local regulatory mechanisms in health and disease. Isolated lung can be perfused with blood or with salt solution including albumin for several hours without functional impairment. The basic advantage of this preparation is the good opportunity to control individual hemodynamic and ventilation parameters in well defined experimental conditions.

### Introduction

Isolated perfused lungs are powerful tool for investigating pulmonary function, structure and local regulatory mechanisms. In comparison to '*in vivo*' studies, the preparation is studied in isolation from other organs and from their effects. Both basic functions, lung ventilation and lung perfusion, can be controlled and measured with reasonable accuracy in preparations obtained from small and inexpensive laboratory animals (rats and mice). Inputs to the system, for example, composition of the perfusate and inspired gas, can be altered according to the objective of the experiment. The transfer of any substrates applied in the extracellular solution occurs via the capillary vasculature in a physiological process. Of course isolated perfused lung possess all of the disadvantages of studies performed on laboratory animals, such as the limits in transfer of findings in human medicine.

\*Corresponding author: J. Herget (Jan.Herget@lfmotol.cuni.cz)

### Section editors:

Jason Yuan – Department of Medicine and Institute for Personalized Respiratory Medicine, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60612, USA

Amy Firth – Laboratory of Genetics, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA 92037, USA

The absence of central integrative mechanisms (both neural and humoral) restricts the obtained view of the organ at the local level. In contrast with other '*in vitro*' methods, the cells in the isolated perfused lung are maintained in their normal anatomical and functional associations. Transcellular transport and diffusion mechanisms occur as they would *in vivo*. Compared with tissue slices or even less organized lung tissue samples, the isolated perfused lung still retains all the basic lung functions, including the exchange of respiratory gases between the atmosphere and the lung perfusate. Preservation of this ability is a key aspect of the viability of the preparation. Last but not least, the currently most widely used preparation of the isolated perfused lung is an uncomplicated technique and does not require special skills or laboratory equipment (Table 1).

### General principles of the '*in vitro*' system

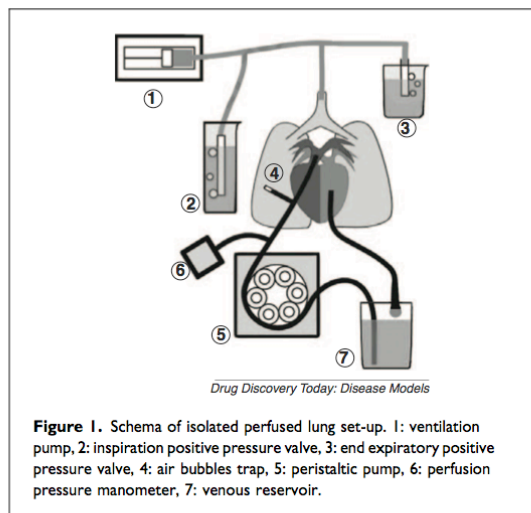
Since the earliest experiments on isolated perfused lungs carried out as early as at the beginning of the last century [1], the basic principle of the technique has not changed much. Typically, the ventilated lungs are perfused through a cannula inserted in the pulmonary artery. The perfusate is collected in a venous reservoir by a cannula inserted in the

**Table 1. Advantages and disadvantages of preparation of isolated lungs**

<b>Advantages</b>	
Controlled	<ul style="list-style-type: none"> <li>– perfusion flow or pressure</li> <li>– composition of perfusate</li> <li>– mechanics of breathing</li> <li>– composition of ventilatory gases</li> <li>– temperature</li> <li>– pressure relation</li> </ul>
Perfusion flow	
Occlusion techniques	
Low cost	
Simplicity and reproducibility	
<b>Disadvantages</b>	
Isolated organ	<ul style="list-style-type: none"> <li>– no neural control</li> <li>– local humoral regulation only</li> <li>– absence of heart pump</li> <li>– effects of mechanical pumping</li> <li>– limited defense mechanisms</li> </ul>
Limited time of viability	
Limited energy stores in perfusate	

left heart. Perfusion is typically performed in a recirculating manner (Fig. 1). Lungs (or separated lung lobes) of most species of experimental animals have been used in the past. Human lungs obtained after resection because of bronchial carcinoma were also successfully tested [2]. In some experiments, isolated perfused lungs were used as an 'oxygenator' for other organs [3].

Lungs can be studied exteriorly from the thorax and placed in a warm and humid chamber. Less often they can be left '*in situ*'. We have personal experience with both, and we did not find any difference, apart from that the fact that the first alternative is technically more simple.



**Figure 1.** Schema of isolated perfused lung set-up. 1: ventilation pump, 2: inspiration positive pressure valve, 3: end expiratory positive pressure valve, 4: air bubbles trap, 5: peristaltic pump, 6: perfusion pressure manometer, 7: venous reservoir.

#### Procedure for the preparation of rat isolated perfused lungs

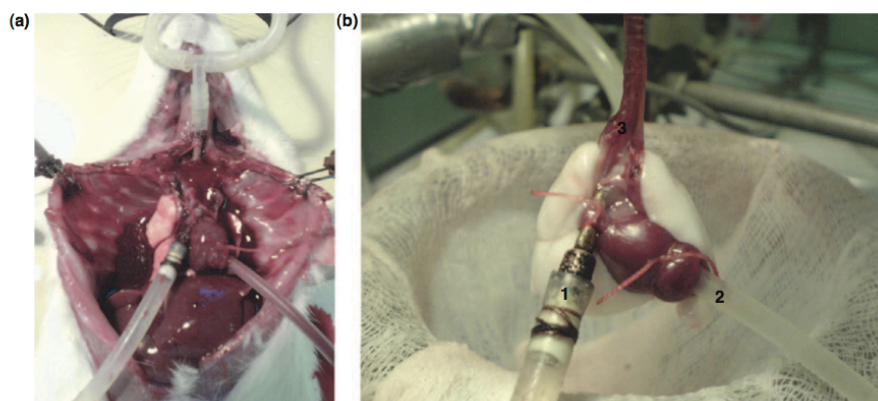
An anesthetized rat is placed in the supine position and secured to the table. Then a cannula is introduced into the trachea and, after medial thoracotomy, it is connected to the ventilator (no positive expiratory pressure is applied at this time). The thorax is supported in a wide open position. A ligature is positioned together under the aorta and the conus of the pulmonary artery as near to the right ventricle as possible and around the heart apex. Heparin in physiologic saline solution (250 I.U.) is injected into the right heart ventricle. Right and left heart ventricles are incised and arterial (inflow in pulmonary artery) and venous (outflow from the left ventricle) cannulae are introduced (Fig. 2a). The entire heart–lung block is then excised from the animal's body. The tracheal cannula connected to the ventilator and the preparation is suspended in a humid chamber (Fig. 2b). Positive end expiratory pressure is restored while the perfusion flow is slowly increased up to the desired value. It is important to start the heating of the preparation at this point. Effluent perfusate is drained from the left ventricular cannula into a reservoir; the outflow pressure is set to  $-2$  mmHg. The first 20 ml of artificial perfusate through the lungs is discarded, leaving a recirculating volume of 30 ml. Then, the lungs are allowed 20 min for stabilization. The preparation should be carefully monitored during the stabilization period with special attention focused on a possible blockade in the outflow tract. At the beginning of perfusion, the contracture of the left heart ventricle may obstruct outflow cannula, which results in an increase in perfusion pressure and the formation of lung edema. Another problem which may appear is the formation of air bubbles in perfusate. Air bubbles can be easily caught by a bubble trap (T piece positioned between the peristaltic pump and arterial cannula).

#### Regulation of lung perfusion in isolated lungs

Collected blood is the most natural fluid for perfusion. For rat and mouse preparations, a sufficient volume of blood for the circuit can be obtained by cardiac puncture from anaesthetized blood donors. The blood donors can be used repeatedly after an interval of a few weeks. An alternative perfusion fluid is a physiologic salt solution combined with plasma expanders (bovine serum albumin or Ficoll). An artificial medium widely used and recommended for rat and mouse lung perfusion is Krebs-Hensley bicarbonate buffer containing bovine serum albumin (Table 2) [4].

The advantage of the blood perfused preparation is that it preserves the vasoconstriction in response to acute hypoxia to such an extent that it is comparable with that observed in '*in vivo*' conditions. In saline perfused lungs, the normal reactivity to hypoxia requires prestimulation with excitatory substances such as plasma, angiogenesis II,  $\text{PGF}_2\alpha$ , ACL or glucocorticoids [5,6]. The same is true for isolated pulmonary blood vessels studied in the salt solution. The disadvantages





Drug Discovery Today: Disease Models

**Figure 2.** Procedure for the preparation of rat isolated perfused lungs. (a) Lungs and heart in chest cavity. (b) Inflow (1), outflow (2) and tracheal (3) cannula positioned in preparation on top of heated and humid chamber.

of using homologous blood for perfusion are undefined blood composition and uncertainty concerning the state of the blood donor. Furthermore, due to the limited energy sources, blood perfusate is not suitable for long lasting experiments [7].

The perfusate is circulated by a pump and various models of suitable peristaltic (roller) pumps are available. The advantage of peristaltic pump is absence of valves and therefore the only part of the pump in contact with perfusate is interior of tube. It makes the system easy to clean. In blood perfused preparations, the combination of fast roller speed and thin tubing decreases pulsations in the circuit but increases the risk of mechanical damage to formed blood elements. Mechanical pumping may result in platelets damage, erythrocyte hemolysis and alteration of polymorphonucleocytes [8]. Estimation of perfusion flow from roller speed is not always accurate, and we recommend a simultaneous direct measurement with the flowmeter included in the circuit. The perfusate is most often used in a recirculating fashion between the lungs and a heated venous reservoir. This technique, despite some of its disadvantages (accumulation of

metabolites, exhaustion of substrates and possible accumulation of damage to the perfusion medium by the circulatory pump) is used most often because a large amount of perfusate is needed in non-recirculating perfusions. In addition, in one pass perfusion the fluid constantly changes, therefore the equilibrium between the perfusate and lung tissue cannot be readily achieved [9].

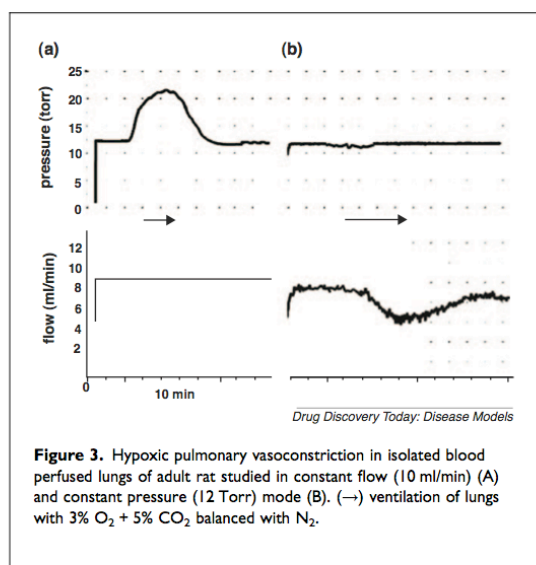
The perfusion can be controlled by perfusion flow (constant flow preparation) or by perfusion pressure (constant pressure preparation). The first arrangement is more simple: the flow of perfusate is directly led to a cannula positioned in the pulmonary artery, and because the flow is constant, the increase in perfusion pressure represents the increase in the resistance to flow. In the second alternative, the perfusion pressure is set to a constant value and an electronic feedback mechanism decreases perfusion flow if the resistance to flow increases (Fig. 3). The pressure controlled peristaltic pumps are commercially available. We are of the opinion that the 'constant pressure' is a better model of physiologic control of lung perfusion. In typical lung regulation, vasoconstriction results in the restriction of downstream perfusion flow and thus regulates the distribution of pulmonary blood flow. There is lower tendency to develop the lung edema after vasoconstriction in 'constant pressure' conditions.

In constant flow preparations, we recommend to begin with low flows of perfusate (about one fourth of the final value). Then, over a period of 10 min, flow is gradually increased to the final value. In rat and mouse isolated lungs, we use a constant perfusion flow of 4 ml/min/100 g body weight of blood or physiologic salt solution perfusate with albumin. Flows ranging from 6 to 15 ml/min for adult rats have been reported; they are dependent upon the apparatus being used in the experiment [6,7,10–18]. Comparable flow

**Table 2.** Composition of salt solution containing albumin for isolated perfused rat lung (in mM)

NaCl	119
KCl	4.7
MgSO <sub>4</sub>	1.17
NaHCO <sub>3</sub>	22.6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.18
CaCl <sub>2</sub>	3.2
Glucose	5.5
Bovine serum albumin (Sigma, fraction V) or Ficoll <sup>a</sup> 4 g/100 ml of solution	

<sup>a</sup> When Ficoll is used, the solution contains 19 mM NaHCO<sub>3</sub> and 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>.



**Figure 3.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated blood perfused lungs of adult rat studied in constant flow (10 ml/min) (A) and constant pressure (12 Torr) mode (B). (→) ventilation of lungs with 3% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> balanced with N<sub>2</sub>.

related to body weight is used in mouse preparations [19]. The outflow pressure is set to  $-2$  mmHg.

Utilizing this system of isolated perfused lungs allows more detailed analysis of lung hemodynamic. The ability to measure, for example, the relationship between perfusion flow and perfusion pressure [11,20] or analysis of distribution of pulmonary vascular resistances by the double occlusion technique [11,21,22]. These methods helped to identify the site of action of physiologic vasoconstrictors (e.g. acute and chronic hypoxia, serotonin, etc.) and to understand the regulatory role of interactions between the individual parts of pulmonary vascular bed.

We discard preparations which, after 20 min of stabilization, have very high basal perfusion pressure (more than 12 Torr with saline perfusate, or more than 17 Torr perfused with blood).

#### Regulation of ventilation in isolated lungs

As previously mentioned the lungs are ventilated via a cannula inserted into the trachea. Ventilation can be accomplished by the periodic inflation of the lung by positive pressure or by the lung expansions induced by negative pressure pulses in the container in which the lung is suspended. The air which surrounds the lung and the inspired gas must be preheated to body temperature and humidified. Preheating of the gas prevents water condensation in the ventilation tubing. There is no substantial difference in pulmonary vascular resistance between positive and negative pressure breathing [17]. Most laboratories have adopted positive pressure ventilation because of technical complications incidental to the negative pressure system. Lungs must be

placed in a sealed chamber, which makes all manipulations and sampling inconvenient.

In the positive pressure ventilated lung, the peak inspiratory pressure is set to  $+10$  cm H<sub>2</sub>O by a pressure water valve, the end expiratory pressure is set to  $+2$  cm H<sub>2</sub>O. The usual ventilation frequency is 50 c/min. During positive pressure ventilation, the changes in the mechanical properties of the lung can be monitored by the Konzett method [23]. The composition of the most frequently used gas for the ventilation of rat and mouse isolated perfused lungs is 21% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 74% N<sub>2</sub>. No difference in lung viability was found between ventilation with gas containing 21% O<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> [24]. Withdrawal of CO<sub>2</sub> leads to alkalosis and lung edema.

#### Regulation of the temperature of the isolated perfused lungs

Most systems use temperatures of 37–38 °C [15,25]. Some authors tend to have the blood perfused preparations at a lower temperature (32–36 °C) [8]. It should be noted that in most systems where tubing is not in a heated environmental box, the temperature of perfusate increases after circulation is stopped. We switch off the heating during the setup procedure and start heating only after the demanded rate of perfusate flow is achieved.

#### Construction of the external perfusion circuit

It was reported that several materials used for the construction of the setup for the perfusion of isolated organs may have toxic effects, or may absorb chemicals in the circuit (for review see [8,9]). Care must be taken when choosing the brand of tubing and plastic connectors to be used. For isolated rat lungs we have had the best experience with the tubing obtained from usual transfusion sets (medical grade PVC, tubing approx. 4–5 mm o.d. with 0.5 mm wall thickness). They are not only suitable in size, but also in our hands free from adverse effects.

The cleaning of the external circuit is a very important procedure. First, all connections must be disconnected and all parts should be washed in 0.9% of NaCl. Then the tubing should be washed through with dilute sodium bicarbonate. All the parts must be cleaned mechanically by brush, the cannulae by pipe cleaners, and plastic tubing by rubbing them between the fingers. Protein residue which remains in the circuit may substantially affect the reactivity of the preparation. Then the tubing is left in the detergent solution overnight. Before the experiment, we wash through the tubing and all other parts of the setup with running tap water (20 min). Then after the circuit is put together, we flush it several times with distilled water, and finally with saline.

#### Viability of isolated perfused lungs

Isolated rat lungs perfused with physiological salt solution are stable even in long experiments lasting several hours [24,26]. The most common indicator of deterioration is an increase of

perfusion pressure which is often linked to imminent lung edema. The development of lung edema can be monitored by continuous recording of the weight of the preparation [14] or by the assessment of the ratio of the dry to wet weight of the preparation which should be less than 0.16 [25,27]. Useful indicators of lung injury are methods which determine changes in alveolo-capillary permeability [18], pulmonary capillary pressure [28] or the ability to transport oxygen from the alveoli into the perfusate [14].

#### Contribution of preparation to understanding the pulmonary vascular pathophysiology

The important benefit of the method is that main regulatory determinants of pulmonary blood vessels are controlled. Studies on isolated lungs of rats exposed to chronic hypoxia brought insight into mechanism of lung hemodynamic changes in hypoxic pulmonary hypertension [20]. Measurements on saline perfused rat lungs reported unexpected low basal production of NO which increased after exposure to chronic hypoxia [29]. The relative simplicity of preparation was found very useful in search for substances suitable for vasodilatory therapy of pulmonary hypertension [4].

#### Conclusion

Isolated perfused murine lung is experimental method suitable for studies on lung hemodynamic and metabolism. It is useful for analyses of acute and chronic increase in pulmonary vascular resistance and for experimental studies on treatment of pulmonary vascular diseases.

#### Acknowledgements

This work is supported by Grant GACR 305/08/0108, Cardiovascular Research Centre 1M510. Authors appreciate the help of Professor Martin Vízek with corrections of the manuscript.

#### References

- Brodie, T.G. (1903) The perfusion of surviving organs. *J. Physiol.* 29, 266–275
- Linder, A. *et al.* (1996) The ex-vivo isolated, perfused human lung model: description and potential applications. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 44, 140–146
- Knowlton, F.P. and Starling, E.H. (1912) Experiments on the consumption of sugar in the normal and the diabetic heart. *J. Physiol.* 45, 146–163
- McMurtry, I.F. *et al.* (1976) Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ. Res.* 38, 99–104
- McMurtry, I.F. (1984) Angiotensin is not required for hypoxic constriction in salt solution-perfused rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 56, 375–380
- Herget, J. and McMurtry, I.F. (1987) Dexamethasone potentiates hypoxic vasoconstriction in salt solution-perfused rat lungs. *Am. J. Physiol.* 253 (Pt 2), H574–H581
- Levey, S. and Gast, R. (1966) Isolated perfused rat lung preparation. *J. Appl. Physiol.* 21, 313–316
- de Burgh Daly, I. and Hebb, C. (1966) *Pulmonary and Bronchial Vascular Systems*, pp. 350–373, Edward Arnold (Publishers) Ltd
- Niemeier, R.W. and Bingham, E. (1972) An isolated perfused lung preparation for metabolic studies. *Life Sci.* 11, 807–820
- Herget, J. and Murtry Mc, I.F. (1985) Effects of ouabain, low K<sup>+</sup>, and aldosterone on hypoxic pressor reactivity of rat lungs. *Am. J. Physiol.* 248, H55–H60
- Herget, J. and Kuklik, V. (1995) Perinatal lung injury extends in adults the site of hypoxic pulmonary vasoconstriction upstream. *Physiol. Res.* 44, 25–30
- Herget, J. *et al.* (1998) Adrenalectomy depresses hypoxic pulmonary vasoconstriction in vitro but does not attenuate the pulmonary hypertension of chronic hypoxia in vivo. *Exp. Clin. Cardiol.* 3, 28–32
- Hodyc, D. *et al.* (2007) Superoxide dismutase mimetic tempol inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats independently of nitric oxide production. *Exp. Physiol.* 92, 945–951
- Hodyc, D. *et al.* (2008) Pre-arrest administration of the cell-permeable free radical scavenger tempol reduces warm ischemic damage of lung function in non-heart-beating donors. *J. Heart Lung Transplant.* 27, 890–897
- Niemeier, R.W. (1984) The isolated perfused lung. *Environ. Health Perspect.* 56, 35–41
- Bernard, C.E. *et al.* (1997) An isolated perfused lung model with real time data collection and analysis of lung function. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 38, 41–46
- Petak, F. *et al.* (2009) Lung mechanical and vascular changes during positive- and negative-pressure lung inflations: importance of reference pressures in the pulmonary vasculature. *J. Appl. Physiol.* 106, 935–942
- Czartolomna, J. *et al.* (1991) Permeability characteristics of isolated perfused rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 70, 1854–1860
- Sharma, A.K. *et al.* (2009) Protection from pulmonary ischemia-reperfusion injury by adenosine A2A receptor activation. *Respir. Res.* 10, 58
- Barer, G.R. *et al.* (1989) Reactivity and site of vasomotion in pulmonary vessels of chronically hypoxic rats: relation to structural changes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 1483–1485
- Hakim, T.S. *et al.* (1982) Partitioning of pulmonary vascular resistance in dogs by arterial and venous occlusion. *J. Appl. Physiol.* 52, 710–715
- Hakim, T.S. *et al.* (1983) Site of pulmonary hypoxic vasoconstriction studied with arterial and venous occlusion. *J. Appl. Physiol.* 54, 1298–1302
- Konzett, H. and Hebb, C.O. (1949) Vaso- and broncho-motor actions of noradrenaline (arterenol) and of adrenaline in the isolated perfused lungs of the dog. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 78, 210–224
- Watkins, C.A. and Rannels, D.E. (1979) In situ perfusion of rat lungs: stability and effects of oxygen tension. *J. Appl. Physiol.* 47, 325–329
- Rhoades, R.A. (1984) Isolated perfused lung preparation for studying altered gaseous environments. *Environ. Health Perspect.* 56, 43–50
- Jirsch, D.W. *et al.* (1971) Twelve hour perfusion of isolated pulmonary lobes. *Chest* 60, 44–48
- Herget, J. (1997) Pulmonary haemodynamics in acute experimental lung vascular injury. *Physiol. Res.* 46, 341–344
- Khimenko, P.L. *et al.* (1998) Tumor necrosis factor- $\alpha$  in ischemia and reperfusion injury in rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 85, 2005–2011
- Isaacson, T.C. *et al.* (1994) Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J. Appl. Physiol.* 76, 933–940

## **11. Rukopis publikace č. 4**



MUDr. Milan Chovanec  
Fyziologický ústav 2. LF UK Praha

Vážený kolego,

Vámi nabídnutý článek

**Patofyziologie hypoxické plicní hypertenze**

byl po recenzi a Vašich úpravách přijat k otištění v časopise Československá fysiologie.  
Redakce se těší na další spolupráci s Vámi.

S pozdravem

Za redakci

Jan Mareš  
Vedoucí redaktor  
Ke Karlovu 4.  
Praha 2

Vztah volných kyslíkových radikálů a oxidu dusnatého při vzniku hypoxické plicní hypertenze

Role of reactive oxygen species and nitric oxide in development of the hypoxic pulmonary hypertension

MUDr. Milan Chovanec

Ústav fyziologie, 2.lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze a Kardiologické oddělení,  
Nemocnice na Homolce, Praha

#### Souhrn:

Plicní cirkulace je jak morfologicky tak i funkčně odlišná od cirkulace systémové. Působením chronické hypoxie vzniká plicní hypertenze (HPH) charakterizovaná vazokonstrikcí a remodelací periferních plicních arteriol. Na tomto procesu se podílí oxid dusnatý (NO) a volné kyslíkové radikály, hlavně superoxid; po interakci s kyslíkovými radikály hraje roli při remodelaci plicních periferních arteriol. Superoxid poškozují stěny prealveolárních plicních cév. Vzniklý peroxynitrit modifikuje kolagen intercelulární matrix periferních plicních arteriol pomocí specifických metaloproteináz, uvolněných z žírných buněk. Štěpení kolagenu se podílí na mechanismu morfologické přestavby periferních plicních cév, která spočívá v muskularizaci a fibrotizaci jejich stěny. Změny vznikají u potkana v průběhu prvního týdne působení chronické hypoxie, což koreluje se vzestupem středního arteriálního krevního tlaku v plicnici. Při déle pokračujícím působení chronické hypoxie tyto procesy již dále neprogredují.

Klíčová slova: hypoxická plicní hypertenze, chronická hypoxie, superoxid, oxid dusnatý.

#### Summary:

Pulmonary circulation is completely different compared to systemic circulation. Chronic hypoxia damages peripheral pulmonary arterioles and causes hypoxic pulmonary hypertension (HPH) which consists of vasoconstriction and remodelling of the arterioles. The release of reactive oxygen species (ROS) – mainly superoxide and nitric oxide (NO) contribute to the pathogenesis of HPH. During exposition to chronic hypoxia, the NO production is markedly elevated and it has two effects: the first, direct vasodilatory effect caused by NO, the second, contribution to remodelling of the peripheral pulmonary vessels by interaction with ROS. The interaction of superoxid and NO releases peroxynitrite which plays a role in the onset of collagen cleavage. A typical low molecular weight of collagen fragments induces remodelling of the peripheral pulmonary arterioles. These changes are typical for the first week of exposure to the chronic hypoxia which also correlates with sudden elevation of the mean pulmonary artery pressure. Continual exposition to the chronic hypoxia after first week does not cause progressive worsening of HPH.

Key words: hypoxic pulmonary hypertension, chronic hypoxia, superoxide, nitric oxide

## ROZDÍLY MEZI PLICNÍ A SYSTÉMOVOU CÍRKULACÍ

Systémová a plicní cirkulace jsou jak morfológicky tak i funkčně odlišné.

V systémové cirkulaci přestupuje kyslík z krve do okolních tkání, zatímco v plicích probíhá proces opačný. V plicní cirkulaci je oproti systémové cirkulaci několikanásobně nižší krevní tlak, což je výhodné vzhledem k tenké a „křehké“ alveolo-kapilární membráně.

Příčinou rozdílného krevního tlaku je odlišný bazální cévní tonus, který je v plicní cirkulaci nízký. Nízký cévní tonus souvisí s množstvím a aktivitou hladké svaloviny v stěně cév.

V plicní cirkulaci je množství hladkého svalu v porovnání se systémovými cévami stejného kalibru menší. Svalovina v periferních prealveolárních cévách se nenachází po celém obvodu (Hislop and Reid 1978).

Další odlišností obou cirkulací je rozdílná závislost průtoku na zvyšujícím se perfuzním tlaku. Průměr cévy závisí na transmúrálním tlaku v cévě. V plicní cirkulaci průměr cévy závisí proto i na intravaskulárním a extravaskulárním (alveolárním) tlaku, povrchovém napětí v alveolech, na vlastnostech plicního parenchymu a také na objemu plic (Dawson et al. 1988; Hampl and Herget 1995).

Plicemi protéká celý minutový srdeční výdej, zatímco v systémovém krevním oběhu je distribuován do jednotlivých orgánů jenom jeho větší nebo menší část. Rychlost průtoku krve plicním cévním řečištěm je vyšší než v systémovém řečišti. S rychlostí průtoku souvisí hodnota střižného napětí (shear stress), která je v plicních cévách větší.

Důležitým funkčním rozdílem plicní a systémové cirkulace je reakce na akutní hypoxii. V systémových cévách při hypoxii dochází obvykle k různě velké vazodilataci. Důsledkem je pak zvýšená perfúze příslušné cévní oblasti, což zajistí přiměřený přísun kyslíku a živin k buňkám. V plicních cévách by tento mechanismus nebyl výhodný, protože vazodilatací by se v nedostatečně ventilovaných plicních segmentech zvyšovala žilní příměs a tím by se zhoršovala transportní schopnost plic pro kyslík. Působením akutní hypoxie (řádově minuty), způsobenou nedostatečnou ventilací plicních segmentů, dochází v plicní cirkulaci, na rozdíl od systémové cirkulace, k vazokonstrikci arteriol a tím k omezení žilní příměsi. Za tento mechanismus, vyvolaný působením akutní hypoxie, je odpovědná depolarizace buněk hladké plicní cévní svaloviny, vyvolaná hypoxickou inhibicí napěťově řízených draslíkových kanálů a zvýšenou intracelulární koncentrací vápníku (Archer et al. 1994; Hampl et al. 1995).



## PLICNÍ HYPERTENZE a CHRONICKÁ HYPOXIE

Reakcí plicní cirkulace na poškození je zvýšení odporu proudění krve a následný vznik plicní hypertenze. Plicní hypertenze je chronicky zvýšený krevní tlak v arteria pulmonalis (PAP) nad hodnotu 25 mmHg. Jednoduchým, levným a dobře reprodukovatelným způsobem, jak můžeme plicní hypertenzi vyvolat, je působení chronické hypoxie (dny až týdny). Chronickou hypoxii můžeme vyvolat snížením barometrického tlaku (hypobarická hypoxie) nebo snížením koncentrace kyslíku ve vdechované směsi plynů při normálním barometrickém tlaku (normobarická hypoxie). První způsob vyvolání plicní hypertenze je typický při pobytu ve vysokých nadmořských výškách, druhý při poruchách plicní ventilace. Působením chronické hypoxie se zvyšuje periferní plicní cévní odpor a vzniká chronická hypoxické plicní hypertenze (HPH). Po dosažení určité hodnoty plicního cévního odporu již k dalšímu zvyšování odporu v plicní cirkulaci nedochází i když působení chronické hypoxie přetrvává, tzn. že HPH není progresivní. Po přerušení expozice hypoxii dochází v průběhu týdnů a měsíců k návratu k původním hodnotám plicního cévního odporu (Herget et al. 1978; Sebkhi et al. 2003), tzn. že HPH je reverzibilní. Na základě těchto vlastností je vhodné na HPH nahlížet ne jako na nemoc, ale spíše jako na adaptační mechanismus plicního cévního řečiště na chronický nedostatek kyslíku.

Na rozvoji HPH se podílejí dva hlavní mechanismy odpovědné za zvýšení cévního plicního periferního odporu: 1) vazokonstrikce prealveolárních plicních cév a 2) jejich morfologická přestavba – strukturální remodelace. Na začátku rozvoje HPH snad převládá vazokonstrikce, s pokračující chronickou hypoxií postupně převládá efekt strukturální remodelace plicních arteriol (Reeves et al. 1986). Mechanismus vazokonstrikce, způsobené chronickou hypoxií se liší od vazokonstrikce, vyvolané působením akutní hypoxie (HPV). Při chronické hypoxii je reakce na akutní hypoxii sice oslabená, ale stále přítomná. Vazokonstrikce při HPH je přítomna při plicním zánětu, plicním edému i v jiných situacích kdy, HPV zcela chybí.

Morfologické změny souvisejí s produkcí hladké svaloviny v oblasti tunica media v stěně prealveolárních arteriol. Zbytněním tunica media, kde původně svalovina není nebo tvoří jen nesouvislou vrstvu, vzniká v periferních plicních arteriolách tvorbou svaloviny histologický obraz „dvojitě laminovaných cév“. Vrstva hladkého svalu je ohraničena vnitřní a zevní elastickou vrstvou. Existuje starší představa, že tvorba svaloviny v místech, kde původně nebyla (nebo byla v omezené míře), způsobí zmenšení průměru periferních plicních arteriol (roste „dovnitř“ lumen cévy, encroaching inward) a tím zvýší periferní plicní cévní

odpor (Barer 1979). Zvýšením periferního plicního odporu se klinicky projeví i mimo plíce rozvojem hypertrofie pravé srdeční komory a vznikem cor pulmonale.

Podíl remodelace plicních periferních arteriol a její vztah k vápníkové sensitizaci zatím není uspokojivě dořešen. V poslední době se objevují názory svědčící proti tomu, že remodelace plicního cévního řečiště působením chronické hypoxie vede ke zvýšení plicní cévní rezistence (Fagan et al. 2004; Howell et al. 2004). Podle těchto názorů hraje působení chronické hypoxie snad důležitější roli na změnu citlivosti plicních hladkých svalových buněk k vápníku – vápníková sensitizace (Somlyo and Somlyo 2003). Tyto výsledky byly zatím získány pouze nepřímou farmakologickou inhibicí *Rho* kinázového systému (fasudil), není proto možné vyloučit i jiný možný mechanismus účinku uvedeného léku (obrázek). Citlivost k vápníku a vazokonstrikce, způsobená systémem *Rho* kináz, může hrát roli v rozdílech vazokonstrikce indukované působením akutní a chronické hypoxie.

Při působení chronické hypoxie a při rozvoji HPH hrají významnou roli oxid dusnatý a volné kyslíkové radikály, které ovlivňují jak cévní tonus, tak remodelaci plicních periferních cév.

## OXID DUSNATÝ

Oxid dusnatý (NO) je radikál vyskytující se hlavně v plynné formě. NO je produkován téměř všemi tkáněmi savců a hraje důležitou roli v řadě biologických pochodů, hlavně v regulaci hemodynamiky, neurotransmisí a zánětu (Ignarro 2000). V plicích vzniká v endotelových buňkách, reakcí semi-esenciální aminokyseliny (v dětství esenciální, v dospělosti nikoli) L-arginin (Palmer et al. 1988) s atomem kyslíku, který pochází z molekuly kyslíku (Moncada et al. 1989). Jako produkt této reakce vzniká aminokyselina L-citrulin (Palmer and Moncada 1989). Celá reakce probíhá v několika krocích pomocí komplexního enzymu NO syntázy (NOS). Tento enzym se v živých organismech nachází ve třech izoformách (Knowles and Moncada 1994): neuronální NOS (nNOS), konstitučně exprimovaná v mozku, dále endoteliální NOS (eNOS), konstitučně exprimovaná endotelem, a konečně inducibilní NOS (iNOS), exprimována dle potřeby v různých buňkách (makrofágy, neutrofilní granulocyty, endotelové buňky atd.). V plicní cirkulaci v časných fázích působení chronické hypoxie produkuje iNOS několikanásobně větší množství NO v porovnání s produkcí konstituční eNOS (Hampl et al. 2006). Vytvořený oxid dusnatý difunduje z endotelových buněk do hladkých svalových buněk, kde působí pomocí druhého posla, cyklickým guanosin monofosfátem (cGMP) (Murad 1986); cGMP aktivuje vápníkem řízené draslíkové kanály,

způsobuje hyperpolarizaci buněčné membrány hladkých svalových buněk plicních arteriol, což působí snížení intracelulární koncentrace vápníku a tím nakonec vazodilataci.

Metabolismus cGMP je v buňce plicního cévního hladkého svalu ovlivněn aktivitou hydrolytického enzymu fosfodiesteráza (PDE). V lidském organismu existuje minimálně 7 izoform tohoto enzymu s různou specifitou k cyklickým nukleotidům. Aktivita PDE5 hraje důležitou roli při ovlivňování tonu cévního hladkého svalu plicních arteriol při stavech, souvisejících se zvýšenou produkcí NO (Braner et al. 1993; Ziegler et al. 1995) i při rozvinuté chronické hypoxické plicní hypertenzi (Cohen et al. 1996). Inhibice PDE je účinná také u pacientů s plicní arteriální hypertenzí (Michelakis et al. 2002) a je doporučována v současné době jako jedna ze tří možností farmakologické léčby plicní arteriální hypertenze u lidí (Galie et al. 2009).

Představa, že nízký cévní plicní tonus je následek zvýšené bazální produkce NO (při plicní hypertenzi by byla pak tato produkce NO snižena), se nepotvrdila (Adnot et al. 1991). Vydechované množství NO i plazmatická koncentrace NO a jeho metabolitů (nitráty, nitrity) v zdravé nepoškozené plicní cirkulaci je prakticky nulová, při chronické hypoxii se tato produkce významně zvýší. Podáním neselektivního blokátoru NOS, L-NAME nedošlo k zvýšení krevního tlaku v plicnici zdravé plicní cirkulace. Na druhou stranu podání L-NAME při rozvinuté HPH už zvýšený PAP ještě více zvýšilo (Hampl et al. 1993; Isaacson et al. 1994). Při chronické hypoxii je také zvýšená produkce NO jak ukazuje nepřímo detekce zvýšené exprese NOS (Xue et al. 1994; Xue and Johns 1996).

## VOLNÉ KYSLÍKOVÉ RADIKÁLY

Koncentrace volných kyslíkových radikálů (ROS) se zvyšuje v plicní cirkulaci při působení chronické hypoxie jak in-vivo tak in-vitro (Chang et al. 1989). Působení ROS souvisí s remodelací periferních plicních arteriol. Produkce ROS je v buňce lokalizovaná na několika místech (pro přehled viz Herget et al. 2000): 1) dýchací řetězec mitochondrie – při hypoxii se zvyšuje produkce superoxidu, 2) aerobní enzymy s flavínovými koenzymy při hypoxii produkují zvýšené množství superoxidu. 3) aktivita xantin oxidázy se při hypoxii zvyšuje. 4) NADPH oxidáza fagocytů, hlavně makrofágů, produkuje superoxid a peroxid vodíku. Tato aktivita je zvýšená předchozí hypoxií. Zdrojem ROS je i NO syntáza. Produkce oxidu dusnatého NO syntázou je podmíněná interakcí dvou podjednotek enzymu; tato interakce je umožněna kofaktorem tetrahydrobiopterinem (BH<sub>4</sub>). V podmínkách oxidačního

stresu převládá oxidovaná forma kofaktoru dihydrobiopterinu ( $\text{BH}_2$ ) nad redukovanou formou  $\text{BH}_4$ . V přítomnosti  $\text{BH}_2$  nedochází k spojení dvou podjednotek NO syntázy (rozpojení - uncoupling). Samostatné (rozdvojené) podjednotky NO syntázy produkují superoxid (Vasquez-Vivar et al. 1998; Crabtree et al. 2009).

Přímé měření volných radikálů v biologických systémech je relativně obtížné, je dané fyzikálně – chemickými vlastnostmi volných radikálů a kompartmentalizací jejich produkce i účinku. Důležitým faktorem je též to, že zatímco v nízké koncentraci často působí jako autokrinní (i parakrinní) regulační působky, v koncentracích větších poškozují buněčné membrány a modifikují jak nukleové kyseliny tak proteiny i lipidy. Účinky regulační i poškozující se mohou překrývat a mohou být odlišné v různých kompartmentech buňky. Stanovení koncentrace volných radikálů v extracelulárním prostoru či různé formy odhadu „antioxidační aktivity“ mají proto omezený význam a složitou interpretaci. Často používaným přístupem je sledování biologického efektu podání látek s antioxidační aktivitou.

V průběhu působení hypoxie v plicní cirkulaci hraje důležitou roli zvýšení produkce superoxidu. Vysoce biologicky aktivní superoxid se v organismu mění na méně reaktivní peroxid vodíku a kyslík enzymem superoxid dismutáza (SOD), což je substrátem indukovatelný mechanismus (McCord and Fridovich 1969). V savčích buňkách se nacházejí dva typy SOD, rozdělené podle kovů v jejich aktivním centru a také podle subcelulární lokalizace: Cu,Zn-SOD se nachází preferenčně v cytoplazmě, Mn-SOD naopak v mitochondriální matrix. Působením chronické hypoxie se zvyšuje aktivita mitochondriální SOD, což také nepřímě ukazuje na předpokládaný zdroj superoxidu. Již po třech hodinách expozice hypoxii začíná být detekovatelné zvýšení aktivity Mn-SOD, její maximální aktivita byla prokázána v průběhu prvního dne expozice hypoxii (Hampl and Herget 2000). Hypotéza o roli ROS při HPH byla poprvé potvrzena experimentálním zvýšením antioxidační aktivity podáváním dimethylurey pokusným potkanům v hypoxii: došlo k zmírnění rozvoje HPH a také zmenšení strukturální remodelace plicních cév (Langleben et al. 1989). Následně byly použity stejně účinné, ale lépe snášené antioxidanty, působící jak extracelulárně (Lachmanova et al. 2005) tak intracelulárně (Elmedal et al. 2004; Chovanec et al. 2008). Tyto výsledky byly potvrzeny i přímým měřením produkce peroxidového radikálu (kapalinová chromatografie), kdy podání N-acetylcysteinu způsobilo zmírnění rozvoje HPH (Hoshikawa et al. 2001).

Cílovým místem působení oxidačního stresu, vyvolaného chronickou hypoxií, se zdá být kolagen v extracelulární matrix periferních plicních arteriol. Působením hypoxie se zvyšuje kolagenolytická aktivita v této části plicního řečiště a hromadí se charakteristické štěpy pojivových bílkovin (Novotna and Herget 1998; Herget et al. 1999). Je prokázáno, že

tyto kolagenové štěpy stimulují mezenchymální proliferaci a tím vedou k strukturální remodelaci plicních periferních arteriol (Gardi et al. 1990; Bačáková et al. 1997). Kolagenolýza (i HPH) se inhibuje antioxidantem N-acetyl-cysteinem (Herget et al. 1999). Nejpravděpodobnější mechanismus účinku ROS na strukturální remodelaci není přímý, ale zřejmě souvisí s interakcí ROS a NO. Interakcí superoxidu a NO vzniká peroxynitrit (Huie and Padmaja 1993). Peroxynitrit není volný kyslíkový radikál, ale je také vysoce reaktivní a na rozdíl od radikálů relativně stabilní molekula s relativně dlouhým poločasem rozpadu. Ve vodním roztoku je v rovnováze se svým konjugátem, slabou kyselinou peroxynitritovou, která má vlastnosti podobné hydroxylovému radikálu (zvýrazněné v kyselém prostředí Muijsers et al. 1997). Peroxynitrit způsobuje nitraci tyrozinových zbytků bílkovin a tím je schopen proteiny poškozovat (tímto způsobem je možné peroxynitrit také stanovit) (Beckman 1996). Významnost peroxynitritu byla opakovaně prokázána působením hyperkapnie, kdy oxid uhličitý, navázáním na molekulu peroxynitritu sníží jeho poločas rozpadu a tím působí k snížení jeho toxicity. Tyto změny vedou k zmírnění HPH (Belik et al. 2009; Chovanec et al. 2009). Zdrojem intersticiálních metaloproteináz, které se pomocí radikálů aktivují, jsou žírné buňky (Vajner et al. 2006; Maxova et al. 2008). Použitím inhibitoru degranulace žírných buněk, kromoglykátu disodného nebo samotného specifického inhibitoru metaloproteináz, Batistamat, došlo v obou případech k redukci plicních cévních změn, vyvolaných chronickou hypoxií a k omezení rozvoje hypoxické plicní hypertenze (Herget et al. 2003; Banasova et al. 2008).

## INTERAKCE ROS a NO PŘI ROZVOJI HPH

Zvýšená produkce ROS, extrémní produkce NO a tvorba peroxynitritu jsou charakteristické pro první dny působení chronické hypoxie. V této době také dochází ke zvyšování plicního arteriálního tlaku (Herget et al. 1978), zahájení strukturální remodelace periferních plicních cév a zvyšováním plazmatické koncentrace nitrotyrozinu (Herget et al. 2000). Blokáda rozvoje HPH podáním antioxidantů je účinná pokud jsou antioxidanty podány v průběhu prvního týdne expozice hypoxií. Aplikace antioxidantů v průběhu rozvinuté a stabilizované HPH (po druhém nebo v třetím týdnu expozice potkanů hypoxií) efektivní není (Lachmanova et al. 2005; Chovanec et al. 2008). Tyto výsledky potvrzují hypotézu, že na začátku expozice hypoxií dochází k největší produkci volných kyslíkových radikálů a nejvyšší produkci peroxynitritu, spojených se vzestupem plicního arteriálního tlaku. V průběhu dalšího působení

chronické hypoxie (od druhého týdne) tyto změny u potkanů ustávají. Hypotéza byla potvrzena přímým měřením produkce radikálů v průběhu prvního ev. druhého týdne expozice chronické hypoxii (Hoshikawa et al. 1995; Hoshikawa et al. 2001). V období, kdy působí chronická hypoxie, ale tlak v plicnici se již nemění, tj. zhruba od druhého týdne expozice, nejsou prokázatelné ani známky progredujícího oxidačního poškození plicní cirkulace.

Produkce NO s těmito změnami částečně koreluje, ale jeho působení není jednoduché. Je potvrzeno, že produkce NO se zvyšuje se zvýšenou expresí NOS v hypoxii. Exprese NOS se zvyšuje po několika hodinách až desítkách hodin od začátku hypoxie (Le Cras et al. 1996). Zvýšená exprese NOS koreluje se zvýšenou produkcí ROS a následnou produkcí peroxynitritu a aktivací strukturální remodelace plicních cév. ROS může působit rozpojení NOS, ta se pak stává sama zdrojem superoxidu a podílí se na radikálovém poškození (Crabtree et al. 2009). V prvních dnech expozice chronické hypoxii se v homogenátech plicního parenchymu zvyšuje rovněž aktivita iNOS. Množství NO, produkované iNOS, několikanásobně převládá nad množstvím produkovaným nově se aktivující eNOS. Použitím selektivního inhibitoru iNOS (L-NIL) na počátku expozice chronické hypoxii (nikoli po 3 týdnech) byl inhibován rozvoj HPH (Hampl et al. 2006). Klíčová je tedy cesta: hypoxické poškození (ROS) – exprese iNOS – interakce NO a ROS – vazokonstrikce a remodelace prealveolárních cév. Množství exspirovaného NO při HPH souvisí s produkcí NO v plicní cirkulaci a nesouvisí s produkcí v paranasálních sinusech (Lundberg et al. 1995) nebo nosní sliznici (Gerlach et al. 1994; Dillon et al. 1996). Po prvním expozice chronické hypoxii je za zvýšenou produkci NO zodpovědná eNOS.

Zatím není jasné, zda zvýšená produkce NO je příčina nebo důsledek působení chronické hypoxie. Existují práce, kde zvýšená produkce NO může být vyvolána zvýšeným střížným napětím (shear stress) plicních cév při vazokonstrikci a to bez působení hypoxie (Everett et al. 1998).

## Poděkování

Prof. MUDr. Janu Hergetovi DrSc. za podporu při sestavování této práce a kritickou diskusi jejího obsahu a Prof. MUDr. Bohuslavu Ošťádalovi DrSc. za pomoc při jazykové korekci této práce.

Kontaktní adresa:

MUDr. Milan Chovanec

Ústav fyziologie, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Plzeňská 130/221

150 00 Praha

*Email:* milan.chovanec@lfmotol.cuni.cz

#### Seznam literatury:

- ADNOT S, RAFFESTIN B, EDDAHIBI S, BRAQUET P, CHABRIER PE: Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 87:1991 155-162.
- ARCHER SL, HUANG JM, HAMPL V, NELSON DP, SHULTZ PJ, WEIR EK: Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1994 7583-7587.
- BAČÁKOVÁ L, WILHELM J, HERGET J, NOVOTNÁ J, ECKHART A: Oxidized collagen stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells. *Exper Molec Pathol* 64:1997 185-194.
- BANASOVA A, MAXOVA H, HAMPL V, VIZEK M, POVYSILOVA V, NOVOTNA J, VAJNEROVA O, HNILICKOVA O, HERGET J: Prevention of mast cell degranulation by disodium cromoglycate attenuates the development of hypoxic pulmonary hypertension in rats exposed to chronic hypoxia. *Respiration* 76:2008 102-107.
- BARER GR: Active control of the pulmonary circulation. In: *Pulmonary Circulation in Health and Disease*. G CUMMING, G BONSIGNORE (eds), Plenum Press, 1979, pp 81 - 99.
- BECKMAN JS: Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 9:1996 836-844.
- BELIK J, STEVENS D, PAN J, SHEHNAZ D, IBRAHIM C, KANTORES C, IVANOVSKA J, GRASEMANN H, JANKOV RP: Chronic hypercapnia downregulates arginase expression and activity and increases pulmonary arterial smooth muscle relaxation in the newborn rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:2009 L777-784.
- BRANER DA, FINEMAN JR, CHANG R, SOIFER SJ: M&B 22948, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, is a pulmonary vasodilator in lambs. *Am J Physiol* 264:1993 H252-258.
- COHEN AH, HANSON K, MORRIS K, FOUTY B, MCMURTY IF, CLARKE W, RODMAN DM: Inhibition of cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase selectively vasodilates the pulmonary circulation in chronically hypoxic rats. *J Clin Invest* 97:1996 172-179.
- CRABTREE MJ, TATHAM AL, AL-WAKEEL Y, WARRICK N, HALE AB, CAI S, CHANNON KM, ALP NJ: Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status: insights from cells with tet-regulated GTP cyclohydrolase I expression. *J Biol Chem* 284:2009 1136-1144.
- DAWSON CA, RICKABY DA, LINEHAN JH, BRONIKOWSKI TA: Distributions of vascular volume and compliance in the lung. *J Appl Physiol* 64:1988 266-273.

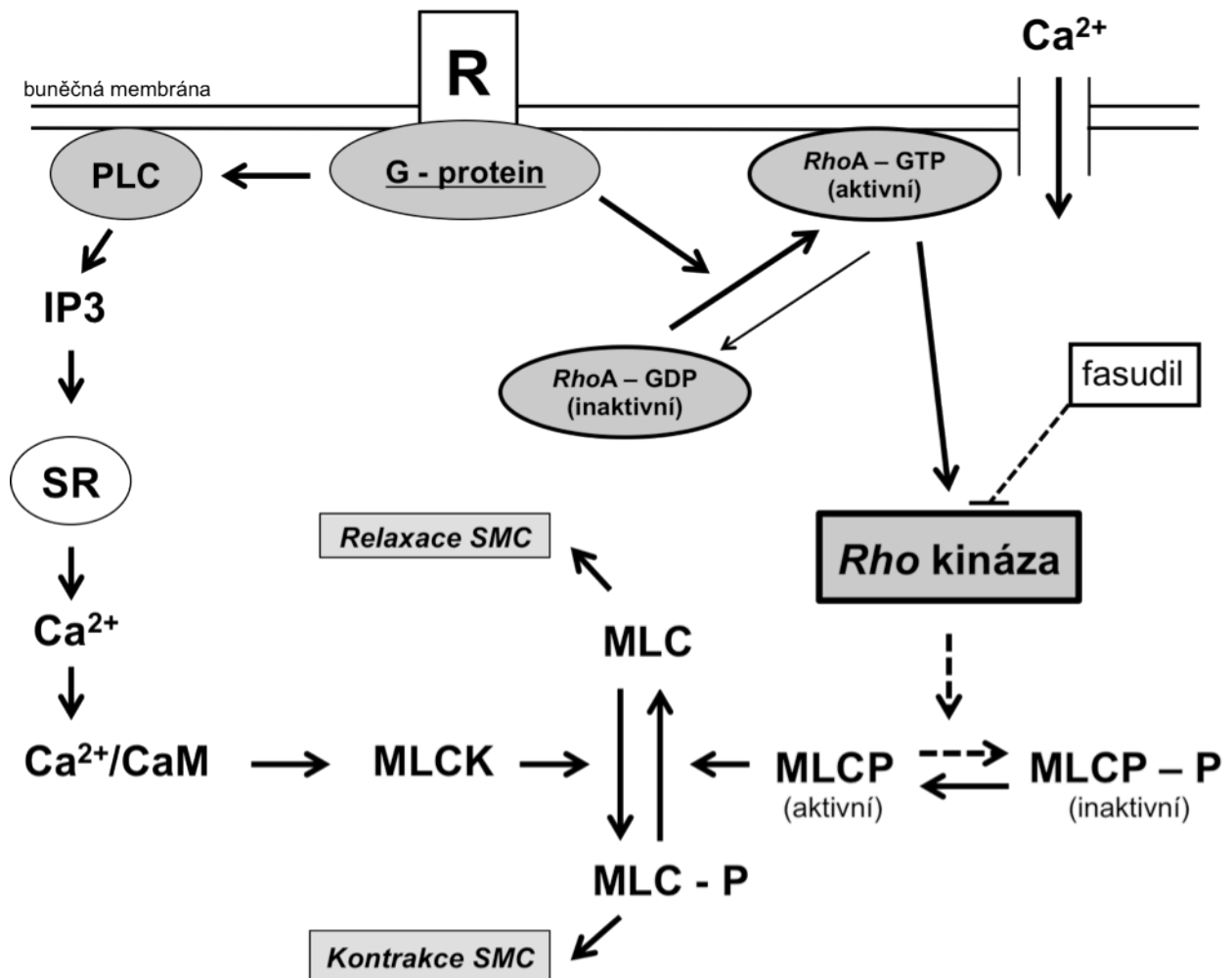
- DILLON WC, HAMPL V, SHULTZ PJ, RUBINS JB, ARCHER SL: Origins of breath nitric oxide in humans. *Chest* 110:1996 930-938.
- ELMEDAL B, DE DAM MY, MULVANY MJ, SIMONSEN U: The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats. *Br J Pharmacol* 141:2004 105-113.
- EVERETT AD, LE CRAS TD, XUE C, JOHNS RA: eNOS expression is not altered in pulmonary vascular remodeling due to increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol* 274:1998 L1058-1065.
- FAGAN KA, OKA M, BAUER NR, GEBB SA, IVY DD, MORRIS KG, MCMURTRY IF: Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:2004 L656-664.
- GALIE N, HOEPER MM, HUMBERT M, TORBICKI A, VACHIERY JL, BARBERA JA, BEGHETTI M, CORRIS P, GAINE S, GIBBS JS, GOMEZ-SANCHEZ MA, JONDEAU G, KLEPETKO W, OPITZ C, PEACOCK A, RUBIN L, ZELLWEGER M, SIMONNEAU G, VAHANIAN A, AURICCHIO A, BAX J, CECONI C, DEAN V, FILIPPATOS G, FUNCK-BRENTANO C, HOBBS R, KEARNEY P, McDONAGH T, MCGREGOR K, POPESCU BA, REINER Z, SECHTEM U, SIRNES PA, TENDERA M, VARDAS P, WIDIMSKY P, SECHTEM U, AL ATTAR N, ANDREOTTI F, ASCHERMANN M, ASTEGGIANO R, BENZA R, BERGER R, BONNET D, DELCROIX M, HOWARD L, KITSIOU AN, LANG I, MAGGIONI A, NIELSEN-KUDSK JE, PARK M, PERRONE-FILARDI P, PRICE S, DOMENECH MT, VONK-NOORDEGRAAF A, ZAMORANO JL: Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 30:2009 2493-2537.
- GARDI C, PACINI A, DE SANTI MM, CALZONI P, VITI A, CORRADESCHI F, LUNGARELLA G: Development of interstitial lung fibrosis by long-term treatment with collagen breakdown products in rabbits. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 68:1990 235-250.
- GERLACH H, ROSSAINT R, PAPPERT D, KNORR M, FALKE KJ: Autoinhalation of nitric oxide after endogenous synthesis in nasopharynx. *Lancet* 343:1994 518-519.
- HAMPL V, ARCHER SL, NELSON DP, WEIR EK: Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 75:1993 1748-1757.
- HAMPL V, BIBOVA J, BANASOVA A, UHLIK J, MIKOVA D, HNILICKOVA O, LACHMANOVA V, HERGET J: Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:2006 L11-20.
- HAMPL V, CORNFIELD DN, COWAN NJ, ARCHER SL: Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *Eur Respir J* 8:1995 515-522.
- HAMPL V, HERGET J: Pulmonary Circulation. In: *Biomechanics of the Cardiovascular System*. ŠRÁMEK B. BO., VALENTA J., KLIMEŠ F. (eds), Czech Technical University Press, Prague, 1995, pp 327 - 339.
- HAMPL V, HERGET J: Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* 80:2000 1337-1372.
- HERGET J, NOVOTNÁ J, BÍBOVÁ J, HAMPL V, POVÝŠILOVÁ V: Hypoxic pulmonary hypertension in rats is inhibited by antioxidant, N-acetyl cysteine. *Physiol Res* 48:1999 54P.



- HERGET J, NOVOTNA J, BIBOVA J, POVYSILOVA V, VANKOVA M, HAMPL V: Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:2003 L199-208.
- HERGET J, SUGGETT AJ, LEACH E, BARER GR: Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax* 33:1978 468-473.
- HERGET J, WILHELM J, NOVOTNA J, ECKHARDT A, VYTASEK R, MRAZKOVA L, OSTADAL M: A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res* 49:2000 493-501.
- HISLOP A, REID L: Normal structure and dimensions of the pulmonary arteries in the rat. *J Anat* 125:1978 71-83.
- HOSHIKAWA Y, ONO S, SUZUKI S, TANITA T, CHIDA M, SONG C, NODA M, TABATA T, VOELKEL NF, FUJIMURA S: Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J Appl Physiol* 90:2001 1299-1306.
- HOSHIKAWA Y, ONO S, TANITA T, SAKUMA T, NODA M, TABATA T, UEDA S, ASHINO Y, FUJIMURA S: [Contribution of oxidative stress to pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 33:1995 1168-1173.
- HOWELL K, OOI H, PRESTON R, MCLOUGHLIN P: Structural basis of hypoxic pulmonary hypertension: the modifying effect of chronic hypercapnia. *Exp Physiol* 89:2004 66-72.
- HUIE RE, PADMAJA S: The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18:1993 195-199.
- CHANG SW, STELZNER TJ, WEIL JV, VOELKEL NF: Hypoxia increases plasma glutathione disulfide in rats. *Lung* 167:1989 269-276.
- CHOVANEC M, HNILICKOVA O, SMOLKOVA P, HERGET J: Interaction of nitric oxide and reactive oxygen species in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *FASEB J* 22:2008 [ABSTRACT] 1209.1208-.
- CHOVANEC M, NOVOTNA J, WILHELM J, HAMPL V, VIZEK M, HERGET J: Hypercapnia attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting lung radical injury. *Physiol Rev* 58:2009 S79-S85
- IGNARRO LJ. 2000. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology. First Edition. ed. Academic Press. 1017 pp.
- ISAACSON TC, HAMPL V, WEIR EK, NELSON DP, ARCHER SL: Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* 76:1994 933-940.
- KNOWLES RG, MONCADA S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 ( Pt 2):1994 249-258.
- LACHMANOVA V, HNILICKOVA O, POVYSILOVA V, HAMPL V, HERGET J: N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sci* 77:2005 175-182.
- LANGLEBEN D, FOX RB, JONES RC, REID LM: Effects of dimethylthiourea on chronic hypoxia-induced pulmonary arterial remodelling and ventricular hypertrophy in rats. *Clin Invest Med* 12:1989 235-240.
- LE CRAS TD, XUE C, RENGASAMY A, JOHNS RA: Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol* 270:1996 L164-170.
- LUNDBERG JO, FARKAS-SZALLASI T, WEITZBERG E, RINDER J, LIDHOLM J, ANGGAARD A, HOKFELT T, LUNDBERG JM, ALVING K: High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nat Med* 1:1995 370-373.

- MAXOVA H, NOVOTNA J, VAJNER L, TOMASOVA H, VYTASEK R, VIZEK M, BACAKOVA L, VALOUSKOVA V, ELIASOVA T, HERGET J: In vitro hypoxia increases production of matrix metalloproteinases and tryptase in isolated rat lung mast cells. *Physiol Res* 57:2008 903-910.
- MCCORD JM, FRIDOVICH I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:1969 6049-6055.
- MICHELAKIS E, TYMCHAK W, LIEN D, WEBSTER L, HASHIMOTO K, ARCHER S: Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 105:2002 2398-2403.
- MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38:1989 1709-1715.
- MUIJSERS RB, FOLKERTS G, HENRICKS PA, SADEGHI-HASHJIN G, NIJKAMP FP: Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci* 60:1997 1833-1845.
- MURAD F: Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 78:1986 1-5.
- NOVOTNA J, HERGET J: Exposure to chronic hypoxia induces qualitative changes of collagen in the walls of peripheral pulmonary arteries. *Life Sci* 62:1998 1-12.
- PALMER RM, ASHTON DS, MONCADA S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:1988 664-666.
- PALMER RM, MONCADA S: A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158:1989 348-352.
- REEVES JT, GROVES BM, TURKEVICH D: The case for treatment of selected patients with primary pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis* 134:1986 342-346.
- SEBKHI A, STRANGE JW, PHILLIPS SC, WHARTON J, WILKINS MR: Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 107:2003 3230-3235.
- SOMLYO AP, SOMLYO AV: Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83:2003 1325-1358.
- VAJNER L, VYTASEK R, LACHMANOVA V, UHLIK J, KONRADOVA V, NOVOTNA J, HAMPL V, HERGET J: Acute and chronic hypoxia as well as 7-day recovery from chronic hypoxia affects the distribution of pulmonary mast cells and their MMP-13 expression in rats. *Int J Exp Pathol* 87:2006 383-391.
- VASQUEZ-VIVAR J, KALYANARAMAN B, MARTASEK P, HOGG N, MASTERS BS, KAROUI H, TORDO P, PRITCHARD KA, JR.: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1998 9220-9225.
- XUE C, JOHNS RA: Upregulation of nitric oxide synthase correlates temporally with onset of pulmonary vascular remodeling in the hypoxic rat. *Hypertension* 28:1996 743-753.
- XUE C, RENGASAMY A, LE CRAS TD, KOBERNA PA, DAILEY GC, JOHNS RA: Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia. *Am J Physiol* 267:1994 L667-678.
- ZIEGLER JW, IVY DD, FOX JJ, KINSELLA JP, CLARKE WR, ABMAN SH: Dipyridamole, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, causes pulmonary vasodilation in the ovine fetus. *Am J Physiol* 269:1995 H473-479.

Obrázek:



Obrázek: Kontrakce hladké svaloviny aktivovaná G-proteiny.

MLC: lehké řetězce myozinu (myosin light chain), MLCK: kináza lehkých řetězců mozinu, MLCP: fosfatáza lehkých řetězců myozinu, R: membránový receptor spřažený s G-proteinem, PLC: fosfolipáza C, IP3: inozitol-1-3-5-trisfosfát, SR: sarkoplazmatické retikulum, CaM: kalmodulin, -P: fosforylace

Převzato a modifikováno z: Nagaoka T, et al., Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171, 494-499